Aus dem Physiologisch-Chemischen Institut der Universität Erlangen-Nürnberg

Direktor: Professor Dr. med. Dr. phil. Friedrich May

Untersuchungen zum Stoffwechsel des Galaktogens und der Galaktose während der Embryonal- und Jugendentwicklung der Weinbergschnecke Helix pomatia

Habilitationsschrift
zur Erlangung der
Venia legendi
für
Physiologische Chemie
der
Hohen Medizinischen Fakultät
der
Friedrich-Alexander-Universität
Erlangen-Nürnberg

Vorgelegt von

Dr. phil. nat. Hans-Joachim Horstmann

Assistent am Physiologisch-Chemischen Institut
der Universität Erlangen-Nürnberg

1964 № 52

Sonderdruck aus *Band 115, Heft 2 (1965)*

Zeitschrift für Biologie

URBAN & SCHWARZENBERG · MÜNCHEN-BERLIN

Alle Rechte, auch die des Nachdrucks, der photomechanischen Wiedergabe und der Übersetzung, vorbehalten

Aus dem Physiologisch-Chemischen Institut der Universität Erlangen–Nürnberg
(Direktor: Prof. Dr. Dr. F. May)

Untersuchungen zum Galaktogen-Stoffwechsel der Weinbergschnecke (Helix pomatia L.)

III. Mitteilung: Der Abbau des Galaktogens bei jungen Tieren

Von H. J. Horstmann

Mit 15 Abbildungen

Eingegangen am 2. April 1965

I. Einleitung

Zu den noch nicht bezwungenen Tropenkrankheiten gehören die von Trematoden verursachten Seuchen bei Mensch und Haustieren (*Piekarski* 1954, *Nauck* 1962). So sind nach den Schätzungen von *Stoll* (1947) etwa 114 Millionen Menschen von Schistosomen befallen. Im Gefolge der landwirtschaftlichen und industriellen Erschließung nimmt die Verbreitung der Bil-

In der Arbeit werden folgende Abkürzungen verwendet:
ADP = Adenosindiphosphat; ATP = Adenosintriphosphat;
NAD^+ = Nicotinamid-adenin-dinucleotid, oxydiert;
NADH = Nicotinamid-adenin-dinucleotid, reduziert;
$NADP^+$ = Nicotinamid-adenin-dinucleotidphosphat, oxydiert;
NADPH = Nicotinamid-adenin-dinucleotid-phosphat; reduziert;
nMol = nano-Mol = 10^{-9} Mol; UDP-Glucose = Uridindiphosphatglucose; UDP-Galaktose = Uridindiphosphat-galaktose.

harziose in den afrikanischen und ostasiatischen Ländern zu (*Kikuth*, zit. nach *Piekarski* 1954), denn der Ausbau der Bewässerungssysteme verschafft den Zwischenwirten dieser Parasiten, bestimmten Arten von Lungen- und Kiemenschnecken, günstige Lebensbedingungen.

Die Bekämpfung der Bilharziose hat sich als schwierig erwiesen. Die bisherigen chemotherapeutischen Maßnahmen führten nur zu begrenzten Erfolgen. Im Vordergrund stehen daher gegenwärtig Bestrebungen, die Schnecken-Zwischenwirte der Trematoden mit chemischen Mitteln zu vernichten. Die verwendeten Chemikalien erwiesen sich jedoch als relativ unspezifisch, da sie auch andere im gleichen Biotop lebende und z. T. für den Menschen nützliche Tierarten schädigen. Erfolgreicher könnten Maßnahmen sein, die nur die Schnecken treffen. Dies setzt eine genaue Erforschung der Biologie und Physiologie dieser Tiere voraus, denn nur dadurch können Besonderheiten ihres Stoffwechsels oder ihrer Lebensweise erkannt werden. Diese Spezialisierungen könnten geeignete Ansätze für die Bekämpfung darstellen.

Suchen wir unter diesem Gesichtspunkt nach entsprechenden biochemischen Sonderleistungen der Lungenschnecken, so stoßen wir auf das Galaktogen, ein aus Galaktose aufgebautes Polysaccharid, das in den Eiern der Pulmonaten in großer Menge enthalten ist. So beträgt der Anteil des Polysaccharids am Trockengewicht der Eier bei der Weinbergschnecke etwa 30 % (*May* 1932), bei *Lymnaea stagnalis* sogar 36 % (*Horstmann* 1956 a). Abweichend von den Verhältnissen bei *Helix pomatia* (*May* und *Weinland* 1953) wird das Galaktogen der Schlammschnecke bereits während der Embryonalentwicklung weitgehend verbraucht (*Horstmann* 1956 a, 1958).

Der Weg des biologischen Abbaus des Galaktogens ist noch ungeklärt. Wir haben uns daher die Aufgabe gestellt, zur Lösung dieser Frage beizutragen. Objekt hierzu war die Weinbergschnecke, deren Eier und Embryonen wegen ihrer Größe für derartige Untersuchungen sehr geeignet sind. Ihre Verwandtschaft mit den Wasserlungenschnecken ließ vermuten, daß gleichartige Abbauwege des Galaktogens eingeschlagen werden, eine Annahme, die im Laufe der bisherigen Untersuchungen an *Lymnaea stagnalis* bestätigt werden konnte.

II. Material und Methoden

1. Aufzucht der Tiere

Züchtung und Haltung der jungen Weinbergschnecken wurden in der II. Mitteilung (*Horstmann* 1965) beschrieben. Nach dem Schlüpfen aus den Eiern wurden die Tiere nicht gefüttert.

2. Atmungsmessungen

Die Versuche wurden mit einem Warburg-Apparat [B. Braun, Melsungen, Modell Z 85] bei 22° C durchgeführt. Es wurden schuhförmige Reaktionsgefäße [Braun-Melsungen Typ A 45-00] verwendet. Der Hauptraum enthielt 3—6 gewogene Schnecken oder Eier

und 100 µl Wasser, der Nebenraum 250 µl 10%ige Natronlauge. Die Schüttelfrequenz betrug 60/min, die Amplitude war 20 mm. Das Thermobarometergefäß enthielt Wasser anstelle der Eier oder Schnecken. Die Versuchsdauer betrug 1—2 Stdn.

Zur Bestimmung des Respiratorischen Quotienten wurde die Druckänderung zunächst bei Abwesenheit von Natronlauge gemessen. Anschließend wurde Lauge in die Einsatzgefäße pipettiert und der Sauerstoff-Verbrauch bestimmt. Aus den beiden Messungen kann die Kohlendioxyd-Produktion und damit auch der RQ berechnet werden (*Umbreit* 1959).

3. *Histochemische Untersuchung*

Die Schnecken wurden 24 Std. bei Zimmertemperatur in dem Gemisch nach *Gendre* (*Romeis* 1948) fixiert. Hierdurch wurde das Gehäuse schonend entkalkt und das Galaktogen in unlöslicher Form gehalten. Anschließend wurden die Tiere in 90proz. Äthanol gespült, in üblicher Weise in Paraffin eingebettet und 10 µ dick geschnitten. Übersichtspräparate wurden in Azan gefärbt. Die Polysaccharide wurden durch Reaktion mit Perjodsäure-Pararosanilin nach *Hotchkiss* dargestellt (*Lipp* 1954).

4. *Herstellung der Extrakte aus Eiern und Schnecken*

Geschlüpfte Schnecken wurden durch Einwerfen in flüssige Luft gefroren und mit Hammer und Skalpell in Fußabschnitt und Schalenabschnitt geteilt. Die Richtung der Schnittführung ist in der Abbildung 2 angegeben. Der Schalenabschnitt enthielt Magen und Mitteldarmdrüse, der Fußabschnitt die übrigen Organe. Eier wurden ohne Einfrieren verarbeitet. Von den Schnekkenabschnitten wurden folgende Extrakte hergestellt:

a) Für die Sedimentationsversuche und zur Bestimmung der β-Galaktosidase wurden Eier und Schalenabschnitte in 0,1 M Kaliumchlorid-Lösung homogenisiert. Nach Klärung durch Zentrifugieren wurde das Homogenat, das den Extrakt von 2 Eiern oder Schnecken pro ml enthielt, für die weiteren Untersuchungen verwendet.

b) Neutrale alkoholische Extrakte der Schnecken dienten zur Bestimmung der freien Monosaccharide. Die gefrorenen Abschnitte von 500—900 gleichaltrigen Tieren wurden in eiskaltem 96proz. Äthanol homogenisiert. Zugabe einer berechneten Wassermenge setzte die Alkoholkonzentration des Homogenates auf 60 % herab. Das Unlösliche wurde abzentrifugiert und mit kaltem 60proz. Äthanol nachextrahiert. Die vereinigten Überstände wurden im Rotationsverdampfer vom Alkohol befreit und anschließend mehrmals mit Chloroform-Methanol (2:1, v/v) zur Entfernung der Lipide ausgeschüttelt. Die wäßrigen Phasen dieser Extraktionen wurden im Rotationsverdampfer stark eingeengt. Sie enthielten die freien Monosaccharide und niederen Oligosaccharide der Schnecken, die auf diese Weise unter Vermeidung saurer Lösungen dargestellt werden konnten.

c) Perchlorsäure-Extrakte der Schnecken dienten zur Gewinnung der Zwischenprodukte des Kohlenhydratstoffwechsels. Die Methode ist bei der Darstellung der freien Nucleotide beschrieben worden (*Horstmann*, 1965). Aus den nucleotidfreien Extrakten wurden die übrigen organischen Phosphate mit Bariumacetat und Alkohol ausgefällt (*Le Page*, 1959) und abzentrifu-

giert. Nach Abdampfen des Alkohols wurde das überschüssige Bariumion mit Schwefelsäure gefällt und die dabei aus dem Bariumacetat entstandene freie Essigsäure mit Äther extrahiert. Die wäßrige Phase der Extraktion wurde im Rotationsverdampfer stark eingeengt. Sie enthielt die freien Monosaccharide neben Salzen und Protein-Abbauprodukten. Durch Papierchromatographie (Steigmittel Methanol-25-proz. Ammoniak — Wasser, 6:1:3, absteigend) wurden die Kohlenhydrate von der Hauptmenge der Begleitsubstanzen abgetrennt. Das Eluat der kohlenhydrathaltigen Zone (R_f 0,60 bis 0,73) wurde über Ionenaustauscher-Säulen (Dowex 50, H^+-Form, anschließend Amberlite CG-45/II, Amino-Form) gereinigt. Die durchlaufende Lösung enthielt nur noch wenig Salze und mit Ninhydrin färbbare Verbindungen. Sie wurde stark eingeengt und wie der alkoholische Extrakt zur Bestimmung der freien Monosaccharide verwendet. Die Barium-Alkohol-Niederschläge dienten zur Bestimmung der Zuckerphosphate.

5. Bestimmungsmethoden

a) Sedimentationsversuche

Die nach 4a hergestellten wäßrigen Extrakte wurden in der analytischen Ultrazentrifuge (Beckman/Spinco, Modell E, Schlierenoptik, Temperatur 20°, Schichtdicke 12 mm) untersucht. Die Berechnung der apparenten Sedimentationskoeffizienten der im Extrakt vorhandenen makromolekularen Komponenten und ihrer Konzentrationen erfolgte in der üblichen Weise (*Elias* 1960).

b) Elektrophorese der Polysaccharide

Jeweils 100 mg fettfreie Trockensubstanz, die aus Eiern und Schnecken durch Behandeln mit Aceton und Extraktion mit Chloroform-Methanol (2:1) hergestellt worden war, wurde mit 2 ml 30proz. Kalilauge 60 Min. lang im siedenden Wasserbad erhitzt. Ein Niederschlag von Calziumcarbonat wurde abzentrifugiert und zweimal mit insgesamt 3 ml Wasser extrahiert. Aus den vereinigten Zentrifugaten wurden die Polysaccharide mit 7 ml 96proz. Äthanol gefällt und abzentrifugiert. Der Bodensatz wurde in 0,5 ml 0,05 M Boratpuffer vom pH 9,8 gelöst. Jeweils 0,005 ml Lösung wurden auf mit dem Puffer angefeuchteten Celluloseacetat-Folien (Membranfiltergesellschaft Göttingen) elektrophoretisch getrennt (Pherograph „Original Frankfurt", Fa. Hormuth & Vetter, Heidelberg. 28 V/cm, 50 mA, 2° C, 25 Min.). Die Polysaccharide wurden unter standardisierten Bedingungen mit p-Rosanilin gefärbt (*Geldmacher-Mallinckrodt* und *May* 1957).

c) Chromatographie

Die zuckerhaltigen Extrakte der Schnecken wurden papierchromatographiert (Papier: Schleicher & Schüll 2043b, ausgewaschen, Steigmittel n-Butanol-Pyridin-Wasser 6:4:3, absteigend 14 bis 30 Stdn.). Mit Benzidin gefärbte Teststreifen dienten zur Markierung der zuckerhaltigen Zonen. Nach

dem Muster dieser Streifen wurden die Zuckerzonen aus dem restlichen Chromatogramm herausgeschnitten und mit Wasser eluiert. Die Zucker wurden durch enzymatische oder colorimetrische Verfahren identifiziert und quantitativ bestimmt.

Die nach *Sperry* (1955) aus aceton-getrockneten Eiern und Schnecken isolierten Lipide wurden durch Dünnschicht-Chromatographie mit der Stufentechnik von *Jatzkewitz* und *Mehl* (1960) auf Kieselgel G-Platten (20 × 20 cm) getrennt. Die Lipide wurden mit Joddampf, Chromschwefelsäure, Ninhydrin, Bials Reagens, Dragendorffs Reagens oder Ammoniummolybdat nachgewiesen (*Mangold* 1962, *Randerath* 1962).

d) Enzymatische und colorimetrische Verfahren

Die papierchromatographisch getrennten und eluierten Hexosen wurden mit der Cystein-Schwefelsäure-Reaktion nach *Dische* (1949) identifiziert und quantitativ bestimmt. D-Galaktose wurde mit Galaktose-Oxydase[1]) (*Fischer* und *Zapf* 1964), D-Glucose mit Glucose-Oxydase[2]) ermittelt.

Galaktose-1-phosphat, Glucose-1-phosphat, Glucose-6-phosphat und Fructose-6-phosphat wurden im gleichen Testansatz bestimmt. Der Test beruht auf folgenden Reaktionen:

1. Glucose-6-phosphat + $NADP^+$ $\rightleftharpoons$ 6-P-gluconat + NADPH + H^+
2. Glucose-1-phosphat $\rightleftharpoons$ Glucose-6-phosphat
3. Fructose-6-phosphat $\rightleftharpoons$ Glucose-6-phosphat
4. Galaktose-1-phosphat + UDP-glucose $\rightleftharpoons$ Glucose-1-phosphat + UDP-galaktose.

Reagenzien: Glycinpuffer 0,5 M, pH 8,7; Cystein: 12,6 mg Hydrochlorid/0,1 ml 1 N Kalilauge; 0,2 M $MgCl_2$; $NADP^+$: 2,2 mg/0,25 ml Wasser; UDP-glucose: 1,4 mg/0,06 ml Wasser; Glucose-1,6-diphosphat: 0,1 µMol/0,1 ml Wasser. Die Reaktionen wurden von folgenden Fermenten katalysiert: 1. Glucose-6-phosphat-dehydrogenase[3]): 70 E[4])/ml; 2. Phosphoglucomutase 13 E/ml; 3. Phosphoglucose-isomerase[3]): 780 E/ml; 4. Galaktose-1-phosphat-Uridyltransferase[5]): 0,08 E/mg Fermentpulver.

Test-Zusammensetzung: 0,2 ml Puffer, 0,15 ml Extrakt aus Schnecken, 0,01 ml Cystein, 0,025 ml $MgCl_2$, 0,05 ml $NADP^+$, Wasser zu 1,0 ml. Die einzelnen Reaktionen wurden nacheinander durch folgende Zusätze ausgelöst: 1. 0,002 ml Ferment und 0,002 ml Glucose-1,6-diphosphat; 2. 0,005 ml Ferment; 3. 0,002 ml Ferment; 4. 0,025 ml Ferment und 0,01 ml UDP-glucose.

Messung bei der Wellenlänge $\lambda = 340$ nm im Beckman Spektrophotometer DK-2, Schichtdicke 1 cm, 20° C.

---

[1]) Präparat der Fa. Worthington, Freehold, N. J., USA.
[2]) Testkombination der Fa. Boehringer & Soehne, Mannheim.
[3]) Präparate der Fa. Boehringer, Mannheim.
[4]) E = Fermenteinheit = Umsatz von 1×10^{-6} Mol Substrat/Min./ mg Enzympulver.
[5]) Herrn Professor *Kurahashi* danken wir für das Präparat.

Test-Verfahren (siehe Abbildung 13): Vor Beginn der Schreibung wurde 8 min lang Stickstoff-Gas durch die Küvette geleitet. Auf diese Weise wurde auch stets nach Zugabe der einzelnen Fermente gemischt. Nach 6 min wurde die Anfangsextinktion (Gerade 1) geschrieben. Nach abermaligem Durchmischen wurde sofort die Kurve 2 geschrieben, um die Wirkung des Durchmischens ohne Substratumsatz verfolgen zu können. Der anfängliche Extinktionssprung fällt nach etwa 5 min auf die Ausgangsextinktion zurück (Gerade 3). Anschließend wurde die Oxydation des Glucose-6-phosphats durch Zugabe von Zwischenferment ausgelöst (Kurve 4). Nach Schreibung der Endextinktion (Gerade 5) wurde Glucose-1-phosphat bestimmt (Kurve 6). Ende der Reaktion nach 8 min (Gerade 7) und Bestimmung von Fructose-6-phosphat (Kurve 8); Endextinktion zeigt Gerade 9. Anschließend wurde der Umsatz von Galaktose-1-phosphat durch Zugabe von Galaktose-1-phosphat-uridyltransferase vorbereitet. Der Verdünnungseffekt bedingt eine Extinktionsabnahme (Kurve 10 bis Gerade 11). Da der Extrakt keine UDP-glucose enthielt, beginnt der Umsatz des Galaktose-1-phosphats erst nach dem Zusatz dieses Transportmetaboliten (Kurve 12). Die Reaktion erreicht nach 15 min ihren Endwert (Gerade 13). Zur Prüfung der Fermente wurden anschließend 80 nMol Galaktose-1-phosphat zugesetzt und die Kurve 14 geschrieben. Trotz dieser relativ hohen Konzentration erfolgt der Umsatz langsam, wie es auch bei dem im Extrakt anwesenden Galaktose-1-phosphat der Fall war.

Dihydroxyacetonphosphat, Fructosediphosphat und Pyruvat, Malat, Glycerin-1-phosphat und Lactat sowie 3-Phosphoglycerat wurden in zusammengesetzten optischen Tests nach *Hohorst* und Mitarbeitern (1959) bestimmt. Glycerin wurde im enzymatischen Test nach *Wieland* (1957) ermittelt.

Für einen optischen Test zur Bestimmung von Glycerinaldehyd konnten keine Angaben in der Literatur gefunden werden. Ausgehend von der Beobachtung, daß die Alkohol-dehydrogenase der Leber eine hohe Affinität für *D*-Glycerinaldehyd besitzt (*Holzer* und *Schneider* 1955), wurde ein Test entwickelt, der auf folgenden Reaktionen beruht:

1. *D*-Glycerinaldehyd + NADH + $H^+ \leftrightharpoons$ Glycerin + NAD^+

2. Glycerin + ATP $\longrightarrow$ Glycerin-1-phosphat + ADP

Da die Alkoholdehydrogenase (Reaktion 1) auch andere Aldehyde umsetzt, ist die Reaktion nicht spezifisch für Glycerinaldehyd. Reaktion 2 wurde benutzt, um den Umsatz nach Reaktion 1 durch Entfernen des Glycerins mit Hilfe von Glycerokinase vollständig zu machen.

Reagenzien: Triäthanolamin-HCl-Puffer, 0,1 M, pH 7,0; $MgCl_2$, 0,2 M; NADH: 2,84 mg/0,5 ml des Puffers; ATP: 22,6 mg/0,5 ml wässeriger Lösung vom pH 7. Alkoholdehydrogenase aus Pferdeleber (Firma Boehringer, Mannheim), 27 E/ml: 0,1 ml der Kristallsuspension wurden abzentrifugiert, der Überstand sorgfältig abpipettiert, der Bodensatz in 0,1 ml des TRA-Puffers gelöst und verwendet. Glycerokinase (Firma Boehringer, Mannheim), 85 E/ml.

Test-Zusammensetzung: 0,5 ml Puffer, 0,2 ml Extrakt aus 40 bis 60 mg Schnecken (Schalenabschnitt), 0,01 ml $MgCl_2$, 0,05 ml NADH, 0,05 ml ATP, 0,025 ml Glycerokinase. Wasser zu 0,95 ml. 0,05 ml Alkoholdehydrogenase. Messung bei der Wellenlänge $\lambda = 340$ nm, Schichtdicke 1 cm.

Test-Verfahren: 1. Prüfung des Tests mit *D,L*-Glycerinaldehyd (Firma Schuchardt, reinst, kristallisiert): Nach Messung der Anfangsextinktion wurde die Reaktion durch Zugabe von 0,025 ml einer Lösung von *D,L*-Glycerinaldehyd (60 mg/ml Wasser, entsprechened 168nMol Substanz/0,025 ml) gestartet. Ende der Reaktion nach 70 min (22° C). Nach Korrektur für den inkonstanten Endwert (*Bergmeyer* 1962) ergab sich eine Extinktionsabnahme von 0,51, entsprechend einem Umsatz von $0{,}51/6{,}22 \times 10^6 = 82$ nMol *D*-Glycerinaldehyd, d. h. es wurde erwartungsgemäß die Hälfte des Racemats verbraucht. 2. Bestimmung des *D*-Glycerinaldehyds im Extrakt: Der Ansatz enthielt bereits die Glycerokinase. Nach Messung der Anfangsextinktion wurde die Reaktion durch Zugabe von Alkoholdehydrogenase ausgelöst. Die Reaktion war gewöhnlich nach 20 min beendet.

Bestimmung der Aktivität der β-Galaktosidase (*Wallenfels* und Mitarbeiter, 1959). Testzusammensetzung: 0,125 ml 1 M NaCl; 0,5 ml o-Nitrophenyl-β-*D*-galaktopyranosid (Firma Sigma, USA); 0,5 % Lösung in TRIS-Puffer, 0,05 M, pH 7,6; 0,33 bis 0,57 ml wässeriger Extrakt aus einem Ei oder einer Schnecke; alles mit dem genannten TRIS-Puffer zu 2,5 ml aufgefüllt.

Test-Vorgang: Die Ansätze wurden 14,5 min bei 40° C inkubiert. Die Messung der Extinktion bei der Wellenlänge 405 nm und der Schichtdicke 1 cm erfolgte 15 min nach Zugabe des Extraktes. Die Eigenextinktion des Extraktes wurde durch Messung gegen einen Ansatz kompensiert, der gleichviel Extrakt, aber kein Nitrophenylgalaktosid enthielt. Einen Tag alte Eier zeigten eine scheinbare Fermentaktivität. Ein Vergleich der Absorptionskurve mit derjenigen des o-Nitrophenols ergab aber, daß diese Extinktion atypisch war. Bei Fortsetzung der Inkubation bis zu 120 min nahm diese Extinktion nicht zu, im Gegensatz zu den Ansätzen, die Extrakte aus Schnekken enthielten.

Nach *Wallenfels* (1959) ist eine Galaktosidase-Einheit diejenige Fermentmenge, die unter den beschriebenen Bedingungen zu einer Spaltung von 1 μg o-Nitrophenyl-galaktosid führt. Die im Ansatz von 2,5 ml hydrolysierte Menge an diesem Substrat ergibt sich zu $48{,}217 \cdot 2{,}165 \cdot 2{,}5 \cdot \log I_0/I$ (μg) (*Horstmann* 1964 a).

III. Ergebnisse

1. Beobachtungen an einem Eigelege

Obwohl die Embryonalentwicklung der Weinbergschnecke unter optimalen Bedingungen bereits in 15 Tagen beendet werden kann, wird die Bruthöhle von den jungen Tieren erst mehrere Wochen später verlassen (*Meisenheimer* 1912, *Kilias* 1960). Um das Verhalten der Schnecken in dieser postembryonalen Periode beobachten zu können, wurde eine künstliche Brut-

höhle in einem mit feuchter Erde gefüllten und mit schwarzem Papier umhüllten Glasgefäß angelegt und mit 25 gerade abgelegten Eiern besetzt.

Die ersten Schnecken schlüpften am 19. Tag nach der Eiablage. Bei den täglichen Beobachtungen wurden sie meistens ruhend in der Nähe der Höhlendecke angetroffen, selten krochen sie träge umher, nie fraßen sie Erde. Am 10. Tag nach dem Schlüpfen hatten sich einige Tiere sehr weit in die Erdschicht der etwa 1 cm starken Höhlendecke hineingeschoben. Fünf Tage später wurde die Erde stark angefeuchtet und mit Salatblättern belegt. Am nächsten Morgen war das Höhlendach eingebrochen; offensichtlich hatte jedoch kein Tier — auch nicht während der Nacht — die Höhle verlassen, denn der Salat zeigte keine Fraßspuren. Erst am nächsten Tage, dem 16. nach dem Schlüpfen der ersten Tiere aus den Eiern, befanden sich drei Schnecken außerhalb der Bruthöhle und fraßen Salat. In den folgenden Tagen krochen auch die übrigen 14 Tiere, die noch geschlüpft waren, heraus. Die Schnecken waren schon beim Verlassen der Höhle verschieden groß; vermutlich hatten die größeren von ihnen die restlichen acht Eier des Geleges gefressen.

Diese Beobachtungen zeigten, daß die jungen Weinbergschnecken unter natürlichen Bedingungen längere Zeit von dem während der Embryonalphase aufgenommenen Eiinhalt zu leben vermögen. Es erschien daher gerechtfertigt, die für die folgenden Versuche verwendeten Tiere einige Wochen ohne Nahrungszufuhr zu halten, ohne eine Schädigung ihres Stoffwechsels befürchten zu müssen.

2. *Sauerstoff-Verbrauch und Respiratorischer Quotient von jungen Weinbergschnecken*

Verfolgt man den Sauerstoff-Verbrauch der heranwachsenden Weinbergschnecke, so erhält man die in der Abbildung 1 dargestellte Kurve. Erst wenige Tage bevor die Tiere aus den Eiern schlüpfen steigt ihre Atmung an. Etwa am 6. Tag nach dem Schlüpfen erreicht die Kurve ihr Maximum. Obwohl die Schnecken keine Nahrung zu sich nahmen, sank ihr Sauerstoff-Verbrauch bis zum Alter von 30 Tagen nur geringfügig. Die für die fortschreitende Differenzierung ihrer Organe notwendige Energie wird offensichtlich völlig von dem im großen Magen gespeicherten Eiinhalt gedeckt. Wie die Respiratorischen Quotienten in der Tabelle 1 zeigen, wird hierbei vornehmlich Kohlenhydrat als Energiequelle verwendet. Daneben wird auch Eiweiß verbrannt, denn die chemischen Untersuchungen der Extrakte aus

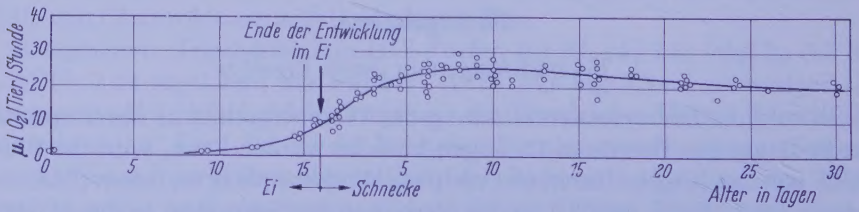


Abbildung 1. Der Sauerstoff-Verbrauch der Weinbergschnecke während ihrer Embryonal- und Jugendentwicklung.

geschlüpften Schnecken, über die später noch berichtet werden wird, ergaben einen hohen Gehalt an freien Aminosäuren und eine mit dem Alter der Tiere fortschreitende Zunahme an Harnsäure (*Horstmann* 1965).

Tabelle 1: RQ-Werte geschlüpfter Weinbergschnecken

Alter (Tage)	RQ		
3	0,92	0,92	0,88
6	0,82	0,91	0,83
10	0,89	0,91	0,83
15	0,79	0,81	0,84
21	0,81	0,83	0,84

Da der Lipidgehalt der Eier sehr gering ist, spielt Fett als Energiequelle für die Entwicklung keine Rolle. Wie später noch gezeigt wird (Abbildung 14), bauen die geschlüpften Schnecken statt dessen fortschreitend Lipide auf.

3. *Der Ort des Galaktogen-Abbaus*

Die schlupfreife Schnecke verzehrt ihr Ei völlig und speichert den Eiinhalt im Magen, der nahezu den gesamten vom Gehäuse umschlossenen Teil des Jungtieres ausfüllt (Abbildung 2). Der unstrukturierte Inhalt dieses Organs wird von einem einschichtigen Epithel umgeben, dessen Zellen besonders im vorderen an den übrigen Körper grenzenden Abschnitt sehr groß sind. Färbungen von Schnitten mit Perjodsäure-Pararosanilin zeigten, daß der Magen und die großen Epithelzellen („albumen cells", *Raven* 1946) Galaktogen enthielten.

Das auffälligste Merkmal der Eiweißzellen ist ihre Fähigkeit, das Galaktogen aus dem Lumen des Magens aufzunehmen. Das Polysaccharid, dessen

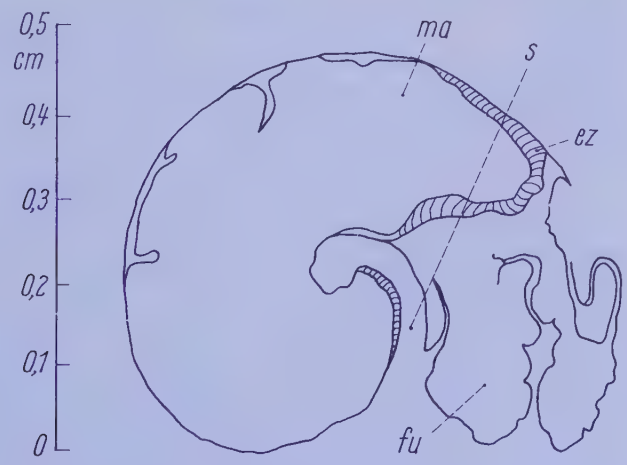


Abbildung 2. Dorsoventraler Längsschnitt durch eine Weinbergschnecke, drei Tage nach dem Schlüpfen aus dem Ei. ma = Magenlumen, ez = Epithelzellen des vorderen Magenabschnittes, fu = Fuß. s = Schnittrichtung zur Teilung der gefrorenen Schnecken in Schalenabschnitt (links) und Fußabschnitt (rechts).

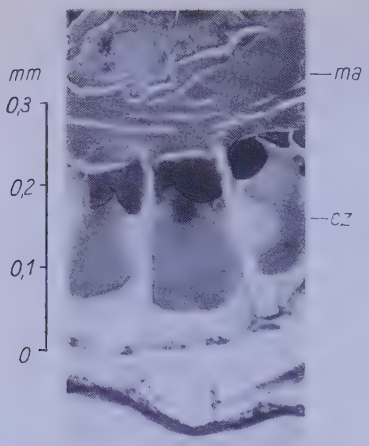


Abbildung 3. Schnitt durch den vorderen Magenabschnitt einer schlupfreifen Weinbergschnecke; 10 μ dick, Azanfärbung. ez = Epithelzellen des Magens („Eiweißzellen"), ma = Magenlumen.

Molekulargewicht bei 4 Millionen liegt (*Horstmann* 1964 b), dringt anscheinend auf breiter Front durch die Membran des apikalen Zellpols (Abbildung 3). Im Zellinneren wird es abgebaut, denn bei älteren Schnecken zerfällt die ursprünglich kompakte Masse in zahlreiche noch intensiv färbbare Tröpfchen.

Der an die Eiweißzellen grenzende Inhalt des Magens verändert bereits bei den unmittelbar vor dem Schlüpfen stehenden Schnecken sein ursprüngliches Aussehen und verliert mit zunehmendem Alter der Tiere seine Färbbarkeit auf Polysaccharide. Es findet daher auch ein intensiver extrazellulärer Abbau der im Magen gespeicherten Substanzen statt. Bei 15 Tage alten Schnecken ist schließlich das gesamte Lumen des Magens mit zahllosen

Abbildung 4. Schnitt durch den Fuß einer Weinbergschnecke, ein Tag nach dem Schlüpfen. Schnittdicke 10 μ, Vergr. 400fach, Perjodsäure-Schiff-Reaktion auf Polysaccharide.

kleinen Tröpfchen gefüllt, die noch eine kräftige Polysaccharid-Reaktion zeigen.

Die histochemischen Untersuchungen gaben auch einen Hinweis auf Synthesen von Polysacchariden, an denen vermutlich die Abbauprodukte des Galaktogens beteiligt sind. So erkennt man bereits bei einen Tag alten Schnecken im Fuß zahlreiche Zellen, die Polysaccharide enthalten (Abbildung 4). Es handelt sich hier neben Glykogen vornehmlich um Glykoproteide des Schneckenschleims.

4. Nachweis des Abbaus der Makromoleküle des Eies durch Sedimentationsversuche

a) Galaktogen

Der histochemische Nachweis des Abbaus der Polysaccharide warf die Frage auf, ob das Galaktogen hierbei zunächst in Bruchstücke ähnlicher Größe gespalten wird, oder ob der Abbau fortschreitend von den nichtreduzierten Endgruppen des Substratmoleküls ausgehend zur völligen Zerlegung des gerade angegriffenen Substratmoleküls führt. Im ersten Fall wäre zu erwarten, daß es zu einer zeitweiligen Anhäufung ähnlich großer Bruchstücke käme, was im Sedimentationsdiagramm erkennbar sein müßte.

Die Abbildung 5 zeigt, daß der Galaktogen-Gehalt (Gradient IV) der Schnecken mit zunehmendem Alter der Tiere abnimmt. Die bei den Eiern noch symmetrische Gradientenkurve zerfällt in den Schneckenextrakten in mehrere Komponenten. Zur Klärung der Frage, welcher dieser Gradienten das noch unveränderte Galaktogen darstellt, war es notwendig, deren Konzentrationen zu bestimmen. Diese können aus den für den Verdünnungseffekt korrigierten Flächen unter den Kurven berechnet werden, wenn man annimmt, daß das Brechungsindex-Inkrement dn/dc des Polysaccharids, das durch Bestimmung des reinen, durch Sedimentation dargestellten Galaktogens (*Horstmann* 1964 b) zu 0,149 ermittelt wurde, auch für Galaktogen-Bruchstücke unverändert bleibt. Da die Sedimentationskoeffizienten der Komponenten von deren Konzentrationen stark abhängig waren, wurde die Sedimentationskonstante s_0 nach der Beziehung $1/s_c = 1/s_0\ (1+k_s c)$ bestimmt, wobei s_c der Sedimentationskoeffizient bei der Konzentration c und k_s eine Konstante ist (*Elias* 1960).

In der Abbildung 6 sind die für die Gradienten IV und V ermittelten Werte im Vergleich zum reinen Galaktogen eingetragen. Die graphische Extrapolation auf die Konzentration 0 ergibt für das reine Polysaccharid und den Gradienten IV ähnliche s_0-Werte. Dieser Gradient stellt somit das fermentativ noch unveränderte Galaktogen dar.

Die hiervon abweichende schneller sedimentierende Komponente V besteht vermutlich nicht oder nicht nur aus Galaktogen. Sie ist vielleicht ein Assoziationsprodukt des Polysaccharids mit einem Protein oder Glykoproteid. Es könnte sich aber auch um eine hochmolekulare Polysaccharidfraktion handeln, die in geringer Konzentration das Galaktogen begleitet und die erst mit fortschreitendem Abbau dieser Hauptfraktion im Sedimen-

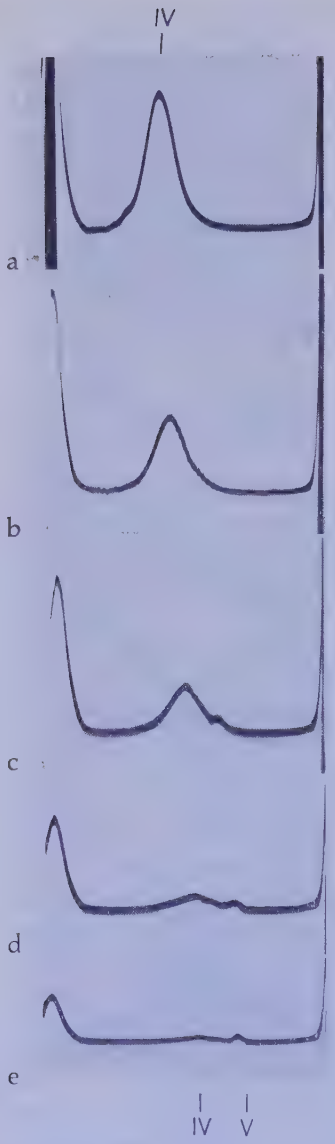


Abbildung 5

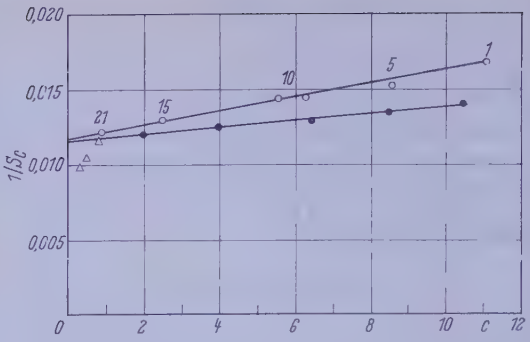


Abbildung 6

Abbildung 5. Sedimentationsdiagramme der Komponenten IV (Galaktogen) und V aus den wässerigen Extrakten von Eiern und geschlüpften Schnecken. Konzentration: zwei Eier oder Tiere (Schalenabschnitte)/ml 0,1 M KCl; 20° C; Phasenwinkel 70°. Aufnahmen jeweils in der 9. Minute nach Erreichen der Rotorgeschwindigkeit 42 040 U/min. a = ein Tag alte Eier; b–e = Schnecken, 5, 10, 15 und 21 Tage nach dem Schlüpfen.

Abbildung 6. Bestimmung der Sedimentationskonstanten des Gradienten IV aus den wässerigen Extrakten geschlüpfter Weinbergschnecken durch Extrapolation der reziproken Sedimentationskoeffizienten $1/s_c$ auf unendliche Verdünnung.
c = Konzentration der Komponenten in mg/ml,
•——• reines Galaktogen (*Horstmann* 1964 b),
o——o Gradient IV. Die Ziffern geben das Alter der untersuchten Schnecken in Tagen an.
△ = Gradient V.

tationsdiagramm deutlich erkennbar wird. Die bei der Sedimentation des reinen Galaktogens beobachtete geringe Asymmetrie der Gradientenkurve würde für diese Annahme sprechen.

Ein Vergleich der Sedimentationsdiagramme der Abbildung 5 zeigt, daß kein neuer Gradient entsteht, der langsamer wäre als das ständig in seiner Konzentration abnehmende Galaktogen. Wir schließen hieraus, daß das Galaktogen nicht durch ein im Innern des Moleküls angreifendes Ferment in größere Bruchstücke zerlegt wird, sondern daß der Abbau fortschreitend

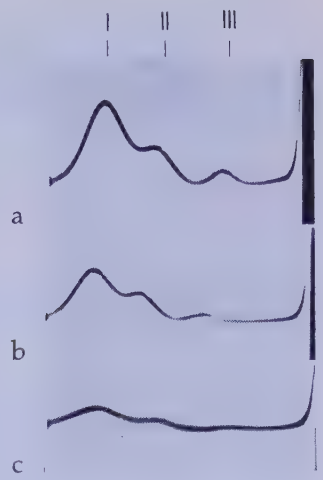


Abbildung 7. Sedimentationsdiagramme der wässerigen Extrakte geschlüpfter Weinbergschnecken nach Sedimentation des Galaktogens. Konzentration: Schalenabschnitte von zwei Tieren/ml 0,1 M KCl. 20° C. Phasenwinkel 70°. Alter der Tiere und Aufnahmezeiten nach Erreichen der Rotorgeschwindigkeit 42 040 U/min: a = ein Tag, 73 min; b = fünf Tage, 65 min; c = 15 Tage, 71 min. Sedimentationskoeffizienten der Gradienten: I = 4,5 S (*Svedberg*-Einheiten), II = 9 S, III = 14 S.

von der Molekülоberfläche her erfolgt und jeweils nur ein geringer Prozentsatz der vorhandenen Polysaccharidmoleküle angegriffen und weitgehend gespalten wird, bevor neue Moleküle vom Ferment angenommen werden.

b) Glykoproteide und Proteine

Mit fortschreitender Sedimentationsdauer können auch die übrigen makromolekularen Komponenten in den Schneckenextrakten getrennt werden (Abbildung 7). Die Abbildung 8 zeigt ihren Abbau im Laufe der postembryonalen Entwicklung. Da die Brechungsindexinkremente der Komponenten mit Ausnahme des Galaktogens unbekannt waren, können ihre absoluten Konzentrationen nicht angegeben werden. Als Ordinatenmaßstab wurde daher das Produkt aus Konzentration und Brechungsindex-Inkrement gewählt, das

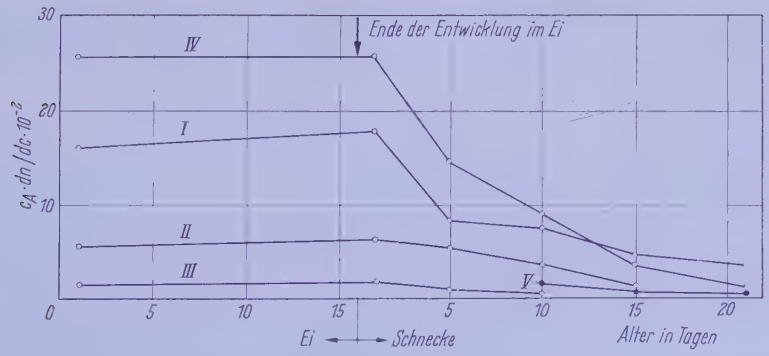


Abbildung 8. Der Gehalt an wasserlöslichen makromolekularen Komponenten in den Eiern und geschlüpften Schnecken, ermittelt durch Sedimentationsanalyse. Ordinate: Produkt aus Konzentration c_A und Brechungsindex-Inkrement dn/dc der betreffenden Komponenten. Die Ziffern bezeichnen die fünf Komponenten: IV ist das Galaktogen.

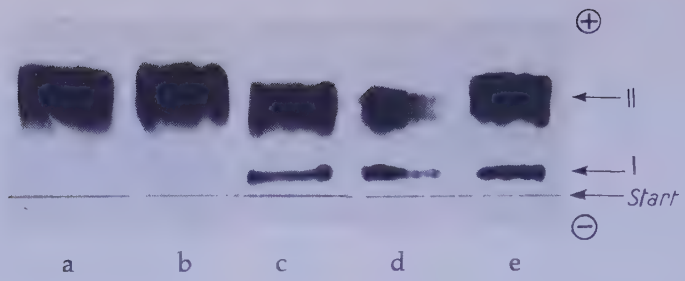


Abbildung 9. Elektropherogramme der Polysaccharide Glykogen (I) und Galaktogen (II) aus Weinbergschnecken. Alter der Tiere: a = zwei Tage vor dem Schlüpfen; b = ein Tag, c = neun Tage, d = 15 Tage nach dem Schlüpfen. e = Vergleichsgemisch aus 40 µg Glykogen und 200 µg Galaktogen.

sich aus der für den Verdünnungseffekt korrigierten Fläche unter der Gradientenkurve und den Konstanten der Ultrazentrifuge errechnen läßt (*Elias* 1960). Die aus den Eiern geschlüpften Schnecken haben sämtliche makromolekularen Komponenten des Eies in ziemlich unveränderter Konzentration aufgenommen. Erst danach beginnt ein mit dieser Methode nachweisbarer Abbau. Bei den 21 Tage alten Tieren beträgt der Galaktogengehalt schließlich nur noch etwa 5 % der ursprünglich im Ei vorhandenen Menge.

5. Die quantitative Bestimmung von Galaktogenabbau und Glykogenbildung

Die für die Sedimentationsversuche verwendeten Tiere stammten aus mehreren Gelegen. Da aber die Eier verschiedener Gelege in Größe und Zusammensetzung etwas variieren können, waren quantitative Aussagen über den Abbau des Galaktogens erst aus Untersuchungen von Schnecken aus demselben Gelege zu erwarten. Die Polysaccharide wurden durch Laugenbehandlung dargestellt. Geschlüpfte Schnecken lieferten dabei ein durch Elektrophorese trennbares Gemisch aus Galaktogen und Glykogen (Abbildung 9). Mit dieser Methode war das Glykogen erstmalig bei den einen Tag alten Schnecken nachweisbar.

Die Ergebnisse der chemischen Bestimmung der beiden Polysaccharide sind in der Abbildung 10 dargestellt. Während der Embryonalentwicklung

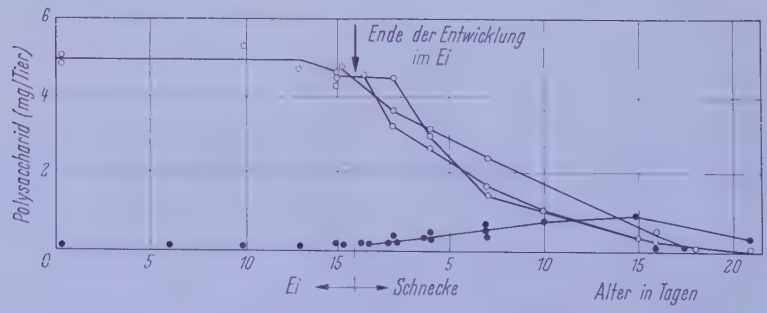


Abbildung 10. Der Gehalt an Galaktogen und Glykogen in den Eiern und geschlüpften Schnecken. o——o Galaktogen, •——• Glykogen. Für das gleiche Gelege geltende Werte sind miteinander verbunden.

nimmt der Galaktogengehalt nur um etwa 5 % ab. Die Glykogenbildung beginnt kurz bevor die Tiere die Eier verlassen, was schon von *May* und *Weinland* (1953) gefunden worden war. Zwischen dem 15. und 20. Tag nach dem Schlüpfen ist der Galaktogenvorrat der Schnecken weitgehend erschöpft und es wird nunmehr auch Glykogen abgebaut. In dieser Zeit verlassen die Tiere ihre Bruthöhle und gehen auf Nahrungssuche.

6. *Vorkommen von β-Galaktosidase*

Der wässerige Extrakt aus dem Gehäuseteil geschlüpfter Schnecken enthielt eine β-Galaktosidase (Tabelle 2). Dieses Ferment wird vermutlich von den Epithelzellen des Magens gebildet und ist wahrscheinlich für den hydrolytischen Abbau des Galaktogens verantwortlich.

Tabelle 2: β-Galaktosidase-Gehalt von jungen Weinbergschnecken

	Alter (Tage)	β-Galaktosidase-Aktivität [Einheiten/Tier]
Eier	1	0
Schnecken	1	39
	5	60
	10	66
	15	74
	21	63

Die Bildung der β-Galaktosidase setzt offensichtlich schon vor dem Schlüpfen der Schnecken ein. Ob diese Enzymsynthese vom Galaktogen induziert wird oder konstitutiv bedingt ist, müssen weitere Untersuchungen ermitteln.

7. *Die Zwischenprodukte des Galaktogen-Abbaus*

a) *Niedere Saccharide*

Das Vorkommen einer β-Galaktosidase ließ vermuten, daß die geschlüpften Schnecken freie Galaktose enthielten. Die Papierchromatographie der durch Frierstopp gewonnenen Extrakte dieser Tiere zeigte neben Galaktose noch Glucose, Mannose und Fucose (Abbildung 11). Bei einen Tag alten Schnecken wurden daneben noch zwei Disaccharide und startnahe Oligosaccharide gefunden. Mit zunehmendem Alter der Tiere sank die relative Konzentration der Galaktose in den Extrakten der Schneckenabschnitte. Oligosaccharide waren später nicht mehr nachweisbar. In den Extrakten der Fußabschnitte überwog stets die Glucose über die Galaktose; Mannose fehlte fast völlig.

Die durch Färbung von Teststreifen markierten Zuckerzonen wurden aus den Chromatogrammen eluiert. Die beiden Disaccharide wurden mit den von *Weinland* (1956 a) aus dem Säurehydrolysat des Galaktogens dargestellten Disacchariden 3-β-*D*-Galaktosido-*D*-galaktose und 6-β-*D*-Galaktosido-*D*-galaktose papierchromatographisch verglichen (Abbildung 12). Die aus den

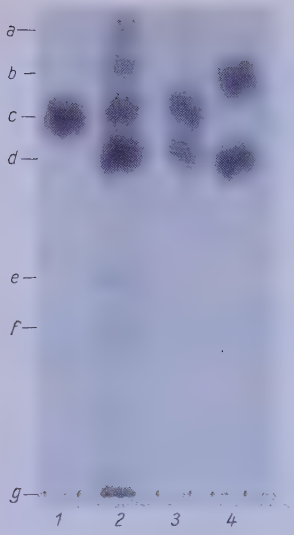


Abbildung 11. Papierchromatogramm der aus den Schnecken isolierten freien Monosaccharide. Benzidin-Reaktion (Methodik 5 c). 1 = Glucose, 25 μg; 2 = Schalenabschnitt einen Tag alter Schnecken; 3 = Fußabschnitt einen Tag alter Schnecken; 4 = Galaktose und Mannose, je 25 μg. a = Fucose; b = Mannose; c = Glucose; d = Galaktose; e und f = Galaktose-Disaccharide; g = Start.

Schnecken isolierten Disaccharide waren hinsichtlich ihrer R_f-Werte und ihres färberischen Verhaltens mit den Vergleichssubstanzen identisch.

Die eluierten Hexosen Glucose, Galaktose und Mannose wurden mit der Cystein-Schwefelsäure-Reaktion nach *Dische* (1949) identifiziert und quantitativ bestimmt (Tabelle 3). Da das Helix-Galaktogen auch *L*-Galaktose enthält (*Bell* und *Baldwin* 1941, *May* und *Weinland* 1954), wurde das Auftreten dieses Zuckers in der Galaktosezone geprüft. Die *D*-Galaktose wurde mit Galaktose-Oxydase bestimmt. Der Gehalt an *L*-Galaktose ergab sich aus der Differenz der colorimetrischen und der enzymatischen Galaktose-Bestimmung. In der Tabelle 3 ist das Ergebnis der Untersuchung zusammengefaßt.

Die Extrakte aller Altersstufen enthielten freie *L*-Galaktose. Offensichtlich wird dieser Zucker enzymatisch abgespalten. Da die *L*-Galaktose wahr-

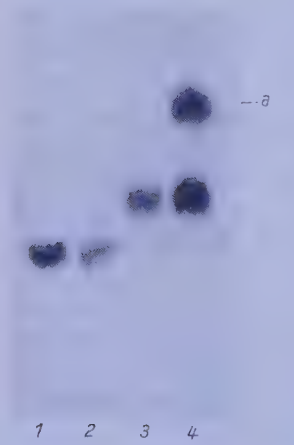


Abbildung 12. Papierchromatogramm der aus einen Tag alten Schnecken isolierten Disaccharide. Benzidin-Reaktion. 1 = 6-β-D-Galaktosido-D-galaktose; 2 und 3 = Disaccharide aus Schnecken; 4 = 3-β-D-Galaktosido-D-galaktose und Galaktose (*a*).

Tabelle 3: Gehalt der Schnecken an freier Galaktose und Glucose

Alter (Tage)	Extrakt[6])	D,L-Galaktose Schalenteil nMol/g	D:L	Fußteil nMol/g	D:L	D-Glucose Schalenteil nMol/g	Fußteil nMol/g
1	a	180	1,9:1	50	2 :1	70	70
5	a	95	2,7:1	50	0,8:1	40	110
	p	70				40	
9	p	35	2 :1	35	1,1:1	30	160
16	p	30	1,1:1	10		130	20

[6]) a = Alkohol-Extrakt (siehe Methodik 4 b)
p = Perchlorsäure-Extrakt (siehe Methodik 4 c)

scheinlich α-gykosidisch im Galaktogen gebunden ist (*Weinland* und *May* 1956), ist es fraglich, ob die β-Galaktosidase die Hydrolyse durchführen kann; vermutlich enthalten die Schnecken noch eine α-Galaktosidase. Aus dem Mengenverhältnis der beiden optischen Isomeren kann nicht ohne weiteres geschlossen werden, daß die *L*-Galaktose ähnlich wie bei der Säurehydrolyse (*May* und *Weinland* 1956, *Renner* und *Weinland* 1957) bevorzugt abgespalten wird. Schlechte Verwertbarkeit dieses Zuckers könnte zu seiner passiven Anreicherung führen.

b) Phosphorylierte Zwischenprodukte des Zuckerstoffwechsels

Die nach Frierstopp und Perchlorsäure-Extraktion dargestellten und einige Male auch durch Bariumfällung angereicherten Zuckerphosphate wurden in enzymatisch-optischen Tests identifiziert und quantitativ bestimmt. In der Abbildung 13 ist ein kombinierter enzymatischer Test für Glucose-6-phos-

Tabelle 4: Metabolitgehalt der Schalenabschnitte junger Weinbergschnecken
Für die Untersuchungen der 9 und 16 Tage alten Schnecken wurden durch Barium-Alkohol-Fällung fraktionierte Perchlorsäureextrakte aus 386 bzw. 729 Schnecken verwendet. Die Metabolite der übrigen Altersstadien wurden in frisch hergestellten Perchlorsäureextrakten aus jeweils 10—30 Tieren bestimmt. Diese Werte sind in einigen Fällen Mittelwerte aus 2—5 Einzelmessungen.

Stadium der Entwicklung	Alter in Tagen	Galaktose-1-P	Glucose-1-P	Glucose-6-P	Fructose-6-P	Glycerin-1-P	3-P-Glycerinsre.	Pyruvat	Lactat	Glycerinaldehyd	Glycerin	Malat
		10^{-9} Mol/g Frischgewicht										
Embryo 1 Tag vor Schlüpfen				13		76		30	1460		81	56
	1		2	10		67	5	31	1470	87	330	71
	2			14		54	10	26	980		356	64
Schnecke	3			8		43	5	10	660	120	637	46
nach dem	4			11		48	6	30	740	140	596	40
Schlüpfen	9	2	2	14	2							
	16	1	4	21								

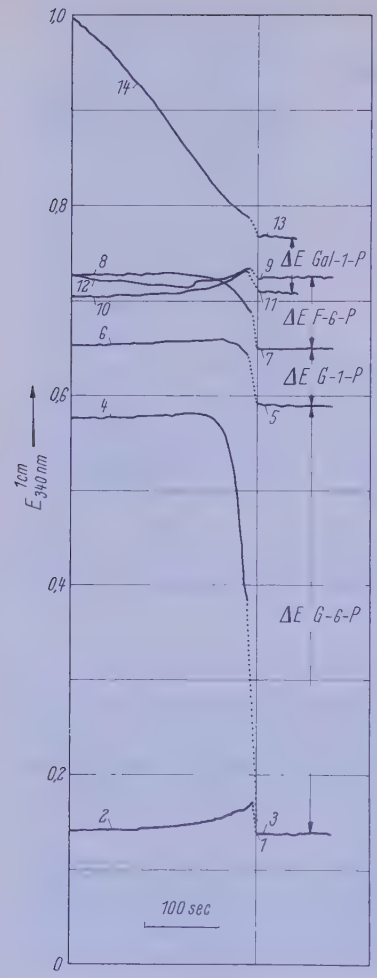


Abbildung 13. Qualitative und quantitative Bestimmung von Glucose-6-phosphat (G-6-P), Glucose-1-phosphat (G-1-P), Fructose-6-phosphat (F-6-P) und Galaktose-1-phosphat (Gal-1-P) im Perchlorsäure-Extrakt der Schalenabschnitte von neun Tage alten Weinbergschnecken. Automatische Registrierung der enzymatischen Reaktionen, Beckman Spectralphotometer DK-2, Wellenlänge λ = 340 nm. Schreibrichtung von rechts nach links. Weitere Erläuterungen siehe Methodik 5 d.

phat, Glucose-1-phosphat, Fructose-6-phosphat und Galaktose-1-phosphat wiedergegeben. In der Tabelle 4 ist der durch diese Messungen ermittelte Metabolitgehalt in nMol/g Frischgewicht eingetragen. Man erkennt, daß die Glucose-phosphate mit dem Alter der Tiere zunehmen. Galaktose-1-phosphat konnte erst bei den älteren Tieren nachgewiesen werden.

Nach den Untersuchungen von *Weinland* (1956 b) enthält das *Helix*-Galaktogen *D*-Galaktose-6-phosphat. Es wurde daher geprüft, ob diese Verbindung beim enzymatischen Abbau des Polysaccharids in der Schnecke in freier Form auftritt.

Die Hexose-monophosphate wurden aus dem Niederschlag der Barium-Alkohol-Fällung der Schneckenextrakte elektrophoretisch abgetrennt. Am C-6 phosphorylierte Glucose und Fructose wurden enzymatisch, am C-1 phosphorylierte Hexosen wurden durch Säure gespalten. Durch erneute Elektrophorese wurden etwa noch vorhandene C-6-Phosphate der Galaktose

und Mannose abgetrennt, aus dem Pherogramm eluiert und mit alkalischer Phosphatase gespalten. Die Anwesenheit von *D*-Galaktose im Inkubinationsansatz wurde mit Galaktose-Oxydase geprüft.

Obwohl die Empfindlichkeit des Tests die Erfassung von 1 μg Galaktose gestattete und durch Kontrollversuche erwiesen war, daß *D*-Galaktose-6-phosphat unter diesen Testbedingungen bestimmbar ist, konnte kein freies Galaktose-6-phosphat in den Extrakten nachgewiesen werden. Da die Konzentration des Orthophosphats während der Inkubation des Extraktes mit der Phosphatase anstieg, war ein im Extrakt noch anwesender säurestabiler Phosphorsäure-Ester, bei dem es sich möglicherweise um Mannose-6-phosphat handelte, auch gespalten worden. Wir müssen hieraus schließen, daß Galaktose-6-phosphat beim biologischen Abbau des Galaktogens nicht in freier Form auftritt. Das Schicksal dieses Esters ist ungeklärt. Er bleibt entweder am Polysaccharidmolekül hängen und blockiert möglicherweise den Abbau in diesem Gebiet oder er wird durch Phosphatasen gespalten, vielleicht während er noch am Makromolekül sitzt oder unmittelbar nach der Loslösung von diesem.

c) Nicht-phosphorylierte Zwischenprodukte

Aus den Untersuchungen von *Doudoroff* und *Deley* (1957) zum Stoffwechsel der Galaktose bei *Pseudomonas* ist bekannt, daß dieser Zucker über Galaktono-γ-lacton, Galaktonat und 2-Keto-3-desoxygalaktonat zu Pyruvat und 3-Phosphoglycerinaldehyd abgebaut werden kann. Trotz sorgfältiger Untersuchung gelang es nicht, in den Perchlorsäure-Extrakten aus ein bis vier Tage alten Schnecken ein präformiertes Lacton oder eine durch Erhitzen mit Salzsäure lactonisierbare Verbindung mit dem Hydroxylamin-Reagenz (*Hestrin* 1949) nachzuweisen. Da weiterhin im Extrakt auch kein 2-Keto-3-desoxygalaktonat durch Papierchromatographie und Färbung mit o-Phenylendiamin gefunden werden konnte, scheint die Weinbergschnecke nicht in der Lage zu sein, Galaktose auf dem von *Doudoroff* beschriebenen Weg abbauen zu können.

Mit enzymatisch-optischen Bestimmungsmethoden konnten einige andere Metabolite in den Schneckenextrakten nachgewiesen werden (Tabelle 4). Schlupfreife und gerade geschlüpfte Schnecken enthielten erhebliche Mengen an Lactat. Die Konzentrationen von Pyruvat und Malat blieben im wesentlichen unverändert. Dagegen nahm der Gehalt an freiem Glycerin nach dem Schlüpfen der Tiere zu. Weiterhin wurde im optischen Test mit Leber-Alkoholdehydrogenase ein Aldehyd gefunden. Bei der nicht strengen Substratspezifität dieses Enzyms ist es jedoch unsicher, ob Glycerinaldehyd vorlag. Freie Glycerinsäure war nicht nachweisbar.

8. Synthesen unter Mitwirkung von Abbauprodukten des Galaktogens

Neben dem Aufbau von Glykogen und besonders von Mucopolysacchariden des Fußsekretes, auf den in früheren Abschnitten hingewiesen worden ist, beobachtet man eine Synthese von Lipiden, die bereits gegen Ende der

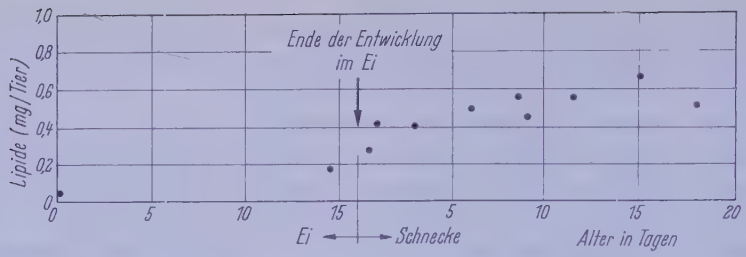


Abbildung 14. Der Gehalt an Lipiden in den Eiern und geschlüpften Tieren der Weinbergschnecke.

Embryonalentwicklung einsetzt (Abbildung 14). Demnach kommt es auch bei der Weinbergschnecke ebenso wie bei *Lymnaea stagnalis* (*Horstmann* 1956 b) zum Aufbau von Lipiden, sobald der Abbau des Galaktogens beginnt. Wir können hieraus schließen, daß Beziehungen zwischen dem Stoffwechsel des Galaktogens und der Fette bestehen.

In der Abbildung 15 ist ein Dünnschichtchromatogramm der aus den Eiern und Schnecken extrahierten Lipide wiedergegeben. Die an den Startstellen aufgetragenen Mengen entsprachen jeweils dem Gehalt eines halben Eies oder Tieres. Frisch abgelegte Eier enthalten im wesentlichen Di- und Triglyceride. Mit zunehmendem Alter treten Cholin- und Colaminphosphatide sowie Cholesterin auf.

Ein großer Anteil der Lipide ein bis neun Tage alter Schnecken wird von einer Substanz geliefert, die nicht identifiziert werden konnte. Sie liegt im R_f-Wert etwas über dem Cholesterin, reagiert bei Besprühen mit Chromschwefelsäure bereits bei Zimmertemperatur mit blauer Farbe, wird aber nach Erhitzen schwarz. Mit den Sterin-Reagenzien Antimontrichlorid und Eisessig-Schwefelsäure erfolgt braune Reaktion; positiv ist die Reaktion mit Joddampf, negativ mit Bials Reagens auf Glykolipide. Bei 15 und 18 Tage alten Schnecken ist die Substanz nicht mehr nachweisbar. Möglicherweise handelt es sich hier um ein Zwischenglied der Cholesterin-Synthese. Nach den Untersuchungen von *Thiele* (1960) enthalten die Lipide der erwachsenen Weinbergschnecke relativ viel Steroide. Auch einige weitere geringere Ablagerungen konnten noch nicht identifiziert werden.

Abbildung 15. Dünnschicht-Chromatogramm der aus den Eiern und Schnecken isolierten Lipide. Am Start wurde jeweils das aus einem halben Ei bzw. einem halben Tier isolierte Material aufgetragen. 1 = einen Tag alte Eier; 2 = Schnecken, etwa zwei Tage vor dem Schlüpfen; 3 bis 8 = geschlüpfte Schnecken, 1, 3, 6, 9, 15 und 18 Tage alt. a = Lecithine; b = Kephaline; c = Cholesterin; d = Diglyceride; e = Triglyceride; f = Cholesterinester.

Im wesentlichen scheint es sich bei den Lipiden der heranwachsenden Schnecken um Verbindungen zu handeln, die Bestandteile von Membranen sind; Depotfette sind dagegen nur in sehr geringer Menge vorhanden.

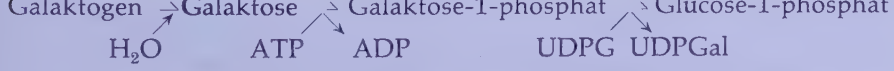
Besprechung der Ergebnisse

Die Untersuchungen zeigten, daß die geschlüpften Weinbergschnecken das in ihrem Magen gespeicherte Galaktogen während der Zeit ihres Aufenthaltes in der Bruthöhle abbauen. Innerhalb von drei Wochen wird das Polysaccharid nahezu völlig verbraucht. Die großen Epithelzellen des Magens scheinen bei diesem Abbau eine wichtige Rolle zu spielen, denn sie können das Galaktogen vermutlich durch Kolloidpermeation aufnehmen und veranlassen seine intra- und extrazelluläre Verdauung.

Die ersten nachweisbaren Spaltprodukte des Galaktogens waren *D*- und *L*-Galaktose. Das im Polysaccharid vorhandene Galaktose-6-phosphat wird in dieser Form nicht frei. Die Hydrolyse des Galaktogens wird wahrscheinlich von der in den Schnecken nachweisbaren β-Galaktosidase bewirkt. Es fanden sich keine Hinweise dafür, daß die Tiere eine für Galaktane spezifische Phosphorylase enthalten. Die bei einen Tag alten Schnecken vorkommenden Disaccharide der Galaktose sind wohl nicht als primäre Abbauprodukte anzusehen, denn sie fehlten bei den älteren Tieren. Ihre Entstehung ist vermutlich auf Transglykosylierungs-Reaktionen zurückzuführen, die durch die β-Galaktosidase veranlaßt werden können (*Wallenfels* 1960).

Der bei der Spaltung entstehenden freien Galaktose stehen theoretisch mehrere Reaktionswege offen, die zum Teil allerdings bisher nur bei Mikroorganismen nachgewiesen wurden. Die Anwesenheit der entsprechenden Zwischenprodukte wurde geprüft. Nicht nachweisbar waren: Galaktosedialdehyd, Dulcit, Tagatose, Galaktonolacton, Galaktonat und 2-Keto-3-desoxygalaktonat. Dagegen waren Galaktose-1-phosphat, Glucose-1-phosphat und Glucose-6-phosphat vorhanden. Bei der Untersuchung der freien Nucleotide der gerade geschlüpften Schnecken wurde gefunden (*Horstmann* 1965), daß der Gehalt der Tiere an den Uridindiphosphaten der Galaktose, Glucose und der N-acetylhexosamine relativ hoch war und mit fortschreitendem Alter der Tiere zunahm. Weiterhin enthielten die Schnecken stets Adenosintriphosphat, wenn auch in einer im Vergleich zu höheren Organismen auffallend geringen Menge.

Von den Zwischenprodukten der bisher bekannten Reaktionsketten, die zum Abbau der Galaktose führen, konnten somit nur die Metabolite des *Leloir*-Weges in den jungen Schnecken nachgewiesen werden. Damit verläuft der Abbau des Galaktogens bei der Weinbergschnecke mit großer Wahrscheinlichkeit nach dem folgenden Schema:



Auf diese Weise wird die Galaktose in die *Embden-Meyerhof*-Kette der Glykolyse eingeschleust. Der hohe Lactat-Gehalt der jungen Schnecken läßt

vermuten, daß ein großer Anteil des Galaktogens auf diesem Wege abgebaut wird. Ein weiterer Anteil wird über die Uridindiphosphat-Hexosen und -Hexosamine zum Aufbau von Polysacchariden verwendet. So beginnt die Synthese von Glykogen schon kurz vor dem Schlüpfen der Schnecken. Weiterhin läßt sich bereits bei einen Tag alten Tieren histochemisch eine intensive Bildung von Glykoproteiden in den Schleimdrüsen des Fußes nachweisen. Diese Mucine wurden nicht untersucht. Es kann aber vermutet werden, daß ihre Kohlenhydratkomponente eine ähnliche Zusammensetzung hat, wie das von *Suzuki* (1962) und *Masamune* (1951) beschriebene Mucin des Schneckenfußes, das N-acetylglucosamin und Galaktose im Verhältnis 1:1 enthielt. Der relativ hohe Gehalt der jungen Schnecken an Zuckerderivaten des Uridindiphosphats spricht für die Bedeutung dieser Transportmetabolite beim Aufbau jener Polysaccharide. Das Galaktogen dient somit den in ihrer Bruthöhle heranwachsenden Schnecken nicht nur als Nährsubstrat sondern auch als Ausgangssubstanz für die Synthese wichtiger Körperbestandteile.

Zusammenfassung

Nach dem Schlüpfen aus den Eiern bleiben die jungen Weinbergschnecken noch mindestens 15 Tage in ihrer Bruthöhle. In dieser Zeit verbrauchen sie das in ihrem Magen gespeicherte Galaktogen weitgehend. Das Polysaccharid wird dabei extra- und intrazellulär abgebaut, wobei das Makromolekül von seiner Oberfläche her fortschreitend in *D*- und *L*-Galaktose gespalten wird. Das im Galaktogen vorhandene Galaktose-6-phosphat wird nicht in dieser Form beim Abbau freigesetzt. Für die Spaltung ist vermutlich eine im Laufe der Entwicklung gebildete β-Galaktosidase verantwortlich.

Die beim Abbau entstehende *D*-Galaktose wird nach Phosphorylierung über den *Leloir*-Weg in Glucose-1-phosphat umgewandelt und findet damit Anschluß an die *Embden-Meyerhof*-Kette der Glykolyse. Alle Zwischenprodukte des *Leloir*-Weges konnten in den Schnecken gefunden werden. Dagegen waren die Metabolite von vier weiteren, aus Untersuchungen an anderen Organismen bekannten Abbauwegen der Galaktose nicht nachweisbar.

Bei den geschlüpften Schnecken wurden einige Synthesen beobachtet, an denen das Galaktogen mit hoher Wahrscheinlichkeit als Ausgangsmaterial beteiligt ist: Wenige Tage vor dem Schlüpfen der Tiere beginnt die Bildung von Glykogen. Der Abbau des Galaktogens wird von einem gleichzeitigen Anstieg des Glykogengehaltes der Schneckengewebe begleitet. Histochemisch konnte bereits bei einen Tag alten Schnecken eine Synthese von Mucopolysacchariden in den Schleimdrüsen des Fußes nachgewiesen werden. Der Lipidgehalt der Tiere nimmt während der Zeit des Galaktogen-Abbaus zu. Diese Lipide bestehen vornehmlich aus Cholesterin, Cholesterinestern und Phosphatiden.

Aus diesen Ergebnissen kann geschlossen werden, daß das Galaktogen, dessen Abbauweg aufgeklärt werden konnte, den jungen Weinbergschnecken während ihres frühen postembryonalen Lebens als Nahrungs- und Baustoff dient.

Frau *E. I. Mittendorf* danke ich für ihre geschickte technische Mitarbeit.

Schrifttum

Bell, D. J. u. *E. Baldwin:* J. Chem. Soc., London (1941), 125.

Bergmeyer, H. U.: Methoden der enzymatischen Analyse. Verlag Chemie, Weinheim 1962, 35.

Dische, Z.: J. biol. Chem. 181 (1949), 379.

Doudoroff, M. u. *J. DeLey:* J. biol. Chem. 227 (1957), 745.

Elias, H. G.: Theory and application of ultracentrifugal techniques. München 1960.

Fischer, W. u. *J. Zapf:* Hoppe-Seylers Z. physiol. Chem. 337 (1964), 186.

Geldmacher-Mallinckrodt, M. u. *F. May:* Hoppe-Seylers z. physiol. Chem. 307 (1957), 180.

Hestrin, S.: J. biol. Chem. 180 (1949), 249.

Hohorst, H. J., F. H. Kreutz u. *Th. Bücher:* Biochem. Z. 332 (1959), 18.
Holzer, H. u. *H. Schneider:* Angew. Chem. 67 (1955), 276.
Horstmann, H. J.: Biochem. Z. 328 (1956a), 342.
Horstmann, H. J.: Biochem. Z. 328 (1956b), 348.
Horstmann, H. J.: Zschr. vergl. Physiol. 41 (1958), 390.
Horstmann, H. J.: Hoppe-Seyler's Zschr. physiol. Chem. 337 (1964a), 57.
Horstmann, H. J.: Biochem. Z. 340 (1964b), 548.
Horstmann, H. J.: Biochem. Z. im Druck.
Jatzkewitz, H. u. *E. Mehl:* Hoppe-Seylers Z. physiol. Chem. 320 (1960), 251.
Kikuth, W.: zit. nach *Piekarski, G.,* Lehrbuch der Parasitologie, Springer, Berlin 1954, S. 279.
Kilias, R.: Weinbergschnecken, VEB Deutscher Verlag d. Wissenschaften, Berlin 1960.
Lipp, W.: Histochemische Methoden, Lfg. I, Bc2 KH 1, S. 11. Oldenbourg, München 1954.
Le Page, G. A.: Methods for the analysis of phosphorylated intermediates, in: Manometric Techniques. Ed. W. W. Umbreit, R. H. Burris and J. F. Stauffer, 3. Aufl. Burgess, Minneapolis 1959, S. 258.
Mangold, H. K. u. *E. Stahl* in: Dünnschicht-Chromatographie, Springer, Berlin 1962, 155.
Masamune, H. u. *Z. Yosizawa:* Tohoku J. Exper. Med. 53 (1951), 155.
May, F.: Zschr. Biol. 92 (1932), 325.
May, F. u. *H. Weinland:* Zschr. Biol. 105 (1953), 339.
May, F. u. *H. Weinland:* Hoppe-Seyler's Zschr. physiol. Chem. 296 (1954), 154.
May, F. u. *H. Weinland:* Hoppe- Seyler's Zschr. physiol. Chem. 305 (1956), 75.
Meisenheimer, J.: Die Weinbergschnecke Helix pomatia L., Leipzig 1912.
Nauck, E. G.: Lehrbuch der Tropenkrankheiten, 2. Aufl., Stuttgart 1962, 50.
Piekarski, G.: Lehrbuch der Parasitologie, Springer, Berlin 1954, S. 278.
Randerath, K.: Dünnschicht-Chromatographie, Verlag Chemie, Weinheim 1962, S. 124.
Raven, Chr. P.: Arch. néerl. Zool. 7 (1946), 353.
Renner, D. H. u. *H. Weinland:* Hoppe-Seyler's Zschr. physiol. Chem. 309 (1957), 52.
Romeis, B.: Mikroskopische Technik, 15. Aufl., Leibniz, München 1948, S. 255.
Sperry, W. M.: Lipide analysis, in: Methods of biochemical analysis (Ed. Glick, D.), Interscience Publ., New York, Bd. 2 (1955), 83.
Stoll, N. R.: J. Parasit. 33 (1947), 1.
Suzuki, S.: J. Biol. Chem. 237 (1962), 1393.
Thiele, O. W.: Hoppe-Seyler's Zschr. physiol. Chem. 321 (1960), 29.
Umbreit, W. W., R. H. Burris and *J. F. Stauffer:* Manometric Techniques. 3. Aufl., Burgess, Minneapolis 1959, S. 28.
Wallenfels, K., M. L. Zarnitz, G. Laule, H. Bender u. *M. Keser:* Biochem. Z. 331 (1959), 459.
Wallenfels, K. u. *O. P. Malhorta:* β-Galactosidase, in: The Enzymes. Ed. P. D. Boyer, H. Lardy u. K. Myrbäck, Academic Press, New York, Bd. 4 (1960), 409.
Weinland, H.: Hoppe-Seyler's Zschr. physiol. Chem. 305 (1956a), 87.
Weinland, H.: Hoppe-Seyler's Zschr. physiol. Chem. 306 (1956b), 56.
Wieland, O.: Biochem. Z. 329 (1957), 313.

Anschr. d. Verf.: Univ.-Doz. Dr. H. J. Horstmann, Physiologisch-Chemisches Institut der Universität, 852 Erlangen, Wasserturmstraße 5

Biochemische Zeitschrift 340, 548—551 (1964)

Untersuchungen zum Galaktogen-Stoffwechsel der Weinbergschnecke (Helix pomatia L.)

I. Darstellung und einige Eigenschaften des nativen Galaktogens aus Eiern

Von

HANS-JOACHIM HORSTMANN

Aus dem Physiologisch-Chemischen Institut der Universität Erlangen-Nürnberg

Mit 3 Figuren im Text

(Eingegangen am 6. Juli 1964)

Galactogen has been isolated from the eggs of the snail Helix pomatia I aqueous extraction and sedimentation in the ultracentrifuge. The polysaccharide polymolecular; its average molecular weight is at $4 \cdot 10^6$. By hot alkali it can split into smaller units, which can be precipitated by dilute alcohol.

Aus den Eiern der Weinbergschnecke wurde das Galaktogen durch Extrakt mit Wasser und Sedimentation in der Ultrazentrifuge isoliert. Das Polysaccha ist polymolekular; sein Molekulargewichts-Mittel liegt bei $4 \cdot 10^6$. Durch he Lauge wird es in kleinere, mit verdünntem Alkohol fällbare Moleküle zerlegt.

Die Molekulargewichte tierischer Polysaccharide sind abhängig v der Methode ihrer Isolierung. So führt die Darstellung des Glykoge nach dem Pflügerschen Verfahren durch Erhitzen mit hochprozentig Lauge [1] oder durch Extraktion mit kalten Lösungen von Trichloressi säure [2] zu einer beträchtlichen Verkleinerung der Moleküle des native Polysaccharids. Dies zeigten Untersuchungen, bei denen das Glykoge mit kaltem Wasser extrahiert und durch hochtouriges Zentrifugier gewonnen worden war [3]. Nach der Pflügerschen Methode behandel Eier der Lungenschnecken [4, 5] liefern ein Galaktogen, das aus eine Gemisch mehrerer, durch Sedimentation voneinander trennbarer pol molekularer Komponenten besteht [6, 7]. Die vorliegende Arbeit b schreibt die Isolierung des nativen Galaktogens aus den Eiern der Wei bergschnecke und zeigt, daß auch dieses Polysaccharid durch heiß Lauge in kleinere Moleküle zerlegt wird.

Methodik

Weinbergschnecken-Eier wurden mit dem gleichen Volumen Wasser verset und homogenisiert. Zur durch Zentrifugieren geklärten Lösung wurde Kaliu chlorid zugegeben, bis eine 0.2 M KCl-Lösung entstand. Das Polysacchar wurde in einer präparativen Ultrazentrifuge sedimentiert (Beckman/Spinco Rotor SB 39; 60 min, 81000 × g). Der gallertige Bodensatz wurde wiederholt

0,2 M KCl gelöst und wie oben sedimentiert. Das Galaktogen wurde danach in destilliertem Wasser gelöst, die Lösung gegen dest. Wasser dialysiert und gefriergetrocknet. Der weiße lockere Rückstand löste sich vollständig in Wasser.

Die weiteren Untersuchungen wurden mit einer analytischen Ultrazentrifuge (Beckman/Spinco E) bei 20° C ausgeführt. Das phosphathaltige Polysaccharid wurde zur Vermeidung von Ladungseffekten in 0,1 M KCl gelöst. Es wurden Aluminiumzellen von 12 mm Lichtweg verwendet.

Zur Bestimmung der Sedimentationskoeffizienten wurden Versuche mit Galaktogenlösungen verschiedener Konzentrationen bei 16200 U/min durchgeführt. Die Wanderstrecke des Kurvenmaximums des Galaktogen-Gradienten wurde auf der photographischen Platte mit einem Meßmikroskop (Ernst Leitz GmbH, Wetzlar) ausgemessen. Diffusionskoeffizienten wurden in einer Ventilzelle [8] bei 2531 U/min ermittelt. Die Berechnung aller Koeffizienten und ihre Extrapolation auf die Konzentration 0 erfolgte in der üblichen Weise [9]. Das partielle spezifische Volumen des Galaktogens ergab sich aus Bestimmungen in einem Präzisionspyknometer. Das Molekulargewichts-Mittel wurde nach der Svedberg-Formel berechnet [10].

Ergebnisse und Diskussion

Ein wäßriger Extrakt aus frisch abgelegten Eiern der Weinbergschnecke gibt, in der analytischen Ultrazentrifuge untersucht, die in der Fig. 1 dargestellten Sedimentationsdiagramme. Neben einem schnell sedimentierenden Gradienten, der dem Galaktogen entspricht, erkennt man noch drei weitere langsamere Komponenten, die vornehmlich Glykoproteide und Proteine enthalten.

Die Fig. 2 zeigt Sedimentationsdiagramme des durch Ultrazentrifugieren dargestellten Galaktogens. Die Verbreiterung des Gradienten ist

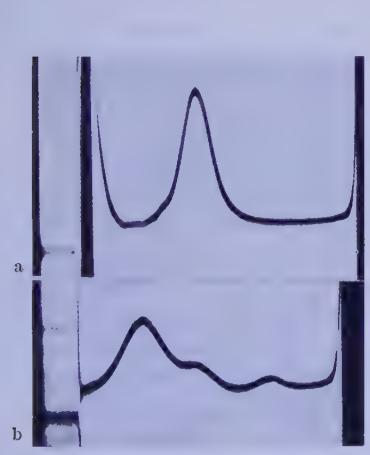


Fig. 1

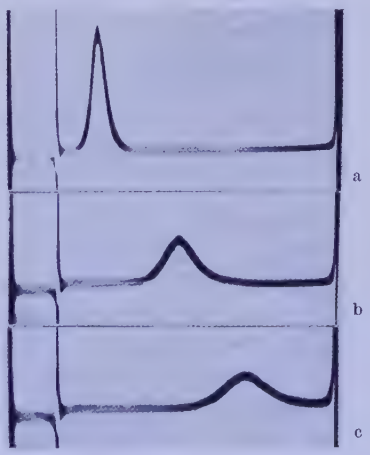


Fig. 2

Fig. 1 a und b. Sedimentationsdiagramm eines wäßrigen Extraktes aus Weinbergschnecken-Eiern. 2 Eier/ml 0,1 M KCl. 42040 U/min. Aufnahmewinkel 70°. Aufnahmen: a 9 min; b 79 min nach Beginn der Sedimentation

Fig. 2 a—c. Sedimentationsdiagramm des Galaktogens. 16200 U/min; c = 0,4 % in 0,1 M KCl. Aufnahmezeiten und Aufnahmewinkel: a 20 min, 60°; b 60 min, 60°; c 92 min, 55°

nicht allein durch Diffusion zu erklären. Offensichtlich ist das Galaktogen polymolekular. Die mit der Versuchsdauer zunehmende Asymmetrie der Gradientenkurve läßt überdies vermuten, daß noch eine höhermolekulare Komponente anwesend ist. Das Kurvenmaximum gibt demnach nur die Sedimentationskoeffizienten derjenigen Polysaccharidfraktion wieder, die wahrscheinlich in der größten Konzentration vorliegt. In der Tabelle sind die den verschiedenen Konzentrationen zugeordneten Koeffizienten der Sedimentation und der Diffusion zusammengefaßt.

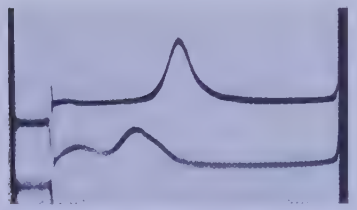


Fig. 3. Sedimentationsdiagramm des unveränderten Galaktogens (obere Kurve; $c = 1\,\%$ in 0,1 M KCl) und des durch Lauge abgebauten Galaktogens (untere Kurve; $c = 1{,}3\,\%$ in 0,1 M KCl). Aufnahmezeit 9 min nach Erreichen der Sedimentationsgeschwindigkeit 42040 U/min; Aufnahmewinkel 75°

Tabelle. *Sedimentations- und Diffusionskoeffizienten des Galaktogens aus Weinbergschnecken-Eiern*

Konzentration (mg/ml)	Sedimentationskoeffizient s (in Svedberg-Einheiten)	Diffusionskoeff. D (in Fick-Einheiten)
10,5	72,0	1,60
8,5	75,0	1,64
6,5	78,4	1,54
4,0	80,4	1,64
2,0	83,5	1,50
0	86	1,5

Die Sedimentationskoeffizienten sind von der Konzentration stark abhängig. Aus den durch Extrapolation auf die Konzentration 0 ermittelten Konstanten der Sedimentation und Diffusion und dem partiellen spezifischen Volumen $\bar{V} = 0{,}67$ ergibt sich für das Molekulargewichts-Mittel des Galaktogens:

$$\bar{M}_{s,D} \sim 4 \cdot 10^6 \; (t = 20^\circ\,\mathrm{C};\; 0{,}1\,\mathrm{M\,KCl})\,.$$

Bei der elektrophoretischen Untersuchung erwies sich das Polysaccharid als einheitlich und negativ geladen (Veronal-acetatpuffer pH 8,7, $\mu = 0{,}075$; Träger: Cellulose-Acetatfolie; 4 Std, 180 V). Die spezifische Drehung betrug $[\alpha]_D^{20}: -16{,}4^\circ$ (Wasser), der Phosphorgehalt [7] war $0{,}53\,\%$, der Aschegehalt $1{,}75\,\%$. Für die Stickstoffbestimmung nach KJELDAHL konnten infolge Substanzmangels nur 10 mg-Proben eingesetzt werden. Sie besaßen keinen nachweisbaren N-Gehalt (weniger als $0{,}1\,\%$ N in der Substanz). Nach Hydrolyse konnte papierchromatographisch nur Galaktose als einziges Monosaccharid gefunden werden.

Das durch Sedimentation dargestellte Galaktogen weicht in seinem Sedimentationsverhalten erheblich von einem durch Erhitzen mit Lauge und anschließende Alkoholfällung gewonnenen Galaktogen ab. Durch diese Behandlung entstehen insgesamt 3 Komponenten mit den Sedimen-

tationskoeffizienten 5,9 (Anteil = 5 %), 12,4 (25 %) und 29,9 *s* (70 %) [6]. Bereits kurze Laugeneinwirkung (20 % KOH, 10 min 100° C) zerlegte das native Galaktogen in polymolekulare Komponenten, deren Maxima bei 46 *s* und 15 *s* lagen (Fig. 3). Die Bruchstücke des auf diese Weise abgebauten Galaktogens sind jedoch noch mit Alkohol fällbar. So wurden 93 % der eingesetzten Menge an 86 *s*-Galaktogen wiedergefunden, nachdem diese 30 min lang in 30 %iger Kalilauge im siedenden Wasserbad erhitzt und zweimal aus 60 %igem Alkohol umgefällt worden war.

Vorläufige Untersuchungen des Galaktogens aus der Schlammschnecke *Lymnaea stagnalis* zeigten, daß auch dieses Galaktan einheitlich und von ähnlicher Größe ist. Es wird ebenfalls bei der Darstellung mit heißer Lauge in Bruchstücke zerlegt [7].

Frau I. Mittendorf danke ich für ihre geschickte technische Mitarbeit.

Literatur

[1] Pflüger, E. F. W.: Pflügers Arch. ges. Physiol. **131**, 201 (1910).
[2] Stetten, M. R., H. M. Katzen, and DeWitt Stetten: J. biol. Chem. **222**, 587 (1956); **232**, 475 (1958).
[3] Orrell, St. A., and E. Bueding: J. Amer. chem. Soc. **80**, 3800 (1958).
[4] May, F.: Z. Biol. **92**, 325 (1932).
[5] Horstmann, H. J.: Biochem. Z. **328**, 342 (1956).
[6] Geldmacher-Mallinckrodt, M., u. G. Träxler: Hoppe-Seylers Z. physiol. Chem. **322**, 112 (1960).
[7] Horstmann, H. J., u. M. Geldmacher-Mallinckrodt: Hoppe-Seylers Z. physiol. Chem. **325**, 251 (1961).
[8] Pickels, E. G.: Meth. Chem. Res. **5**, 107 (1952).
[9] Elias, H. G.: Theory and application of ultracentrifugal techniques. München: Beckman Instruments 1960.
[10] Svedberg, Th., u. K. O. Pedersen: Die Ultrazentrifuge. Dresden: Th. Steinkopff 1940.

Priv.-Doz. Dr. H. J. Horstmann,
Physiologisch-Chemisches Institut der Universität,
852 Erlangen, Wasserturmstraße 5

Biochemische Zeitschrift 342, 23—30 (1965)

Untersuchungen zum Galaktogen-Stoffwechsel der Weinbergschnecke (Helix pomatia L.)

II.* Der Gehalt an freien Nucleotiden bei jungen Schnecken

Von
HANS-JOACHIM HORSTMANN

Aus dem Physiologisch-Chemischen Institut der Universität Erlangen-Nürnberg

Mit 3 Figuren im Text

(Eingegangen am 21. Januar 1965)

The distribution pattern of free nucleotides has been determined in 1 to 16 days old edible snails (Helix pomatia L.) using ion exchange chromatography. The nucleotide contents increased with the age of the animals, but it never exceeded 600 n moles per gram of wet weight. The adenine nucleotides generally amounted to less than 50 per cent of the total nucleotides; the amount of UDP hexoses and UDP hexosamines was 10 to 16 per cent.

Bei 1—16 Tage alten Weinbergschnecken wurde das Verteilungsmuster der freien Nucleotide durch Ionenaustausch-Chromatographie bestimmt. Der Nucleotidgehalt der Tiere nahm mit ihrem Alter zu, stieg aber nie über 600 nMol/g Frischgewicht. Der Anteil der Adeninnucleotide am gesamten Nucleotidgehalt lag im allgemeinen unter 50%; derjenige der UDP-Hexosen und UDP-Hexosamine betrug 10—16%.

Die aus den Eiern geschlüpften Weinbergschnecken bleiben noch einige Wochen in ihrer Bruthöhle. Während dieser Zeit verbrauchen die Tiere den im Laufe der Embryonalentwicklung gespeicherten Vorrat an Galaktogen. Im Rahmen der Untersuchung über den biologischen Abbau dieses ungewöhnlichen Polysaccharids erwies es sich als notwendig, den Gehalt und das Verteilungsmuster der freien Nucleotide in den Geweben der jungen Schnecken kennenzulernen, um Aufschluß über den Stoffwechseltyp und die Art der gruppenübertragenden Coenzyme des Kohlenhydrat-Stoffwechsels zu bekommen.

---

* I. Mitteilung: HORSTMANN, H. J.: Biochem. Z. **340**, 548 (1964).

Abkürzungen. AMP = Adenosinmonophosphat; ADP = Adenosindiphosphat; ATP = Adenosintriphoshat; GMP = Guanosinmonophosphat; GTP = Guanosintriphosphat; HS = Harnsäure; IMP = Inosinmonophosphat; P = Orthophosphat; U = Uridin; UMP = Uridinmonophosphat; UDP = Uridindiphosphat; UDPA = Uridindiphosphat-N-acetyl-hexosamin; UDPG = Uridindiphosphat-glucose; UDPGal = Uridindiphosphat-galaktose; UTP = Uridintriphosphat.

Ergebnisse

Perchlorsäure-Extrakte aus 1—16 Tage alten Weinbergschnecken wurden durch Ionenaustausch-Chromatographie fraktioniert. Die Fig. 1 bis 3 zeigen einige typische Chromatogramme. Die Position der Gipfel im Chromatogramm und das Verhältnis ihrer Extinktionen bei den

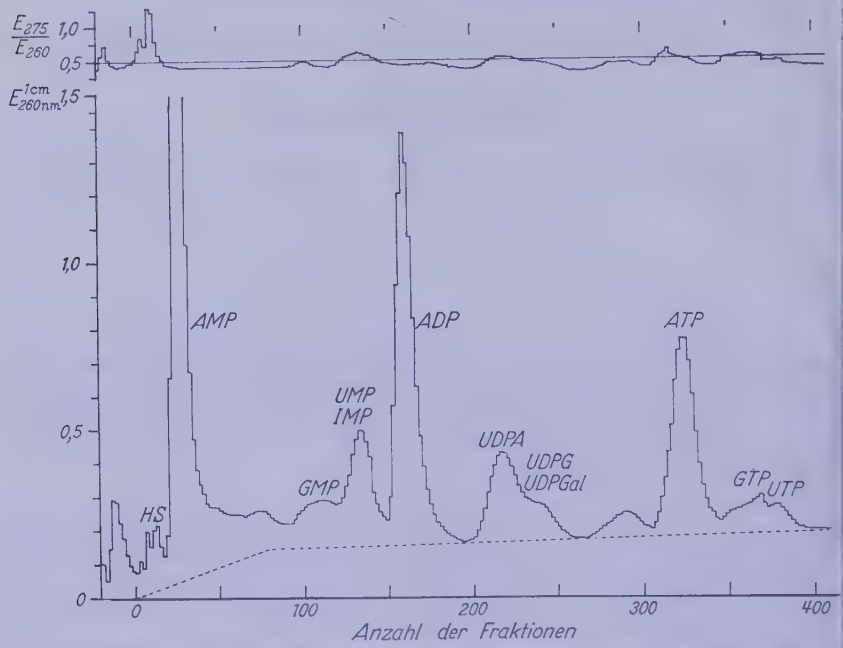


Fig. 1. Chromatogramm des sauren Extraktes aus 69 g Schalenabschnitten 1 Tag alter Weinbergschnecken. Fraktionsvolumen 1,8 ml. Fraktion 1—166 = 0—3 M HCOOH; Fraktion 167—296 = 3 M HCOOH, 0—0,2 M $HCOONH_4$; Fraktion 297—420 = 3 M HCOOH, 0,2—1 M $HCOONH_4$

Wellenlängen 275 nm und 260 nm gaben erste Hinweise auf die Art der Nucleotide [1, 2]. In höherer Konzentration anwesende Nucleotide wurden gereinigt und durch ihr UV-Spektrum [3] und ihre chemische Zusammensetzung identifiziert.

In der Tab. 1 ist der auf das Frischgewicht der Tiere bezogene Gehalt an einigen Nucleotiden wiedergegeben. Die Berechnung erfolgte aus der Gesamtextinktion der getrennten Fraktionen, dem Fraktionsvolumen und dem Extinktionskoeffizienten der betreffenden Nucleotide. Zur Herstellung der Extrakte wurden die in flüssiger Luft gefrorenen Schnecken in Schalen- und Fußabschnitt geteilt. Da besonders der Schalenabschnitt viel extracelluläres Material, nämlich den Mageninhalt und das Kalkgehäuse, enthielt, das bei der Präparation nicht entfernt werden konnte, stellen die Werte der Tabelle keine Gewebe-Gehalte dar.

Die Fraktion der UDP-Hexosen und UDP-Hexosamine nahm mit fortschreitendem Alter der Tiere zu. Im Fußteil fiel besonders die starke Vermehrung des IMP auf. Im Schalenabschnitt stieg der Gehalt an Adeninnucleotiden bis zum 5. Tag. Danach blieben AMP und ADP im wesentlichen unverändert, wogegen ATP allmählich abnahm. Der sehr

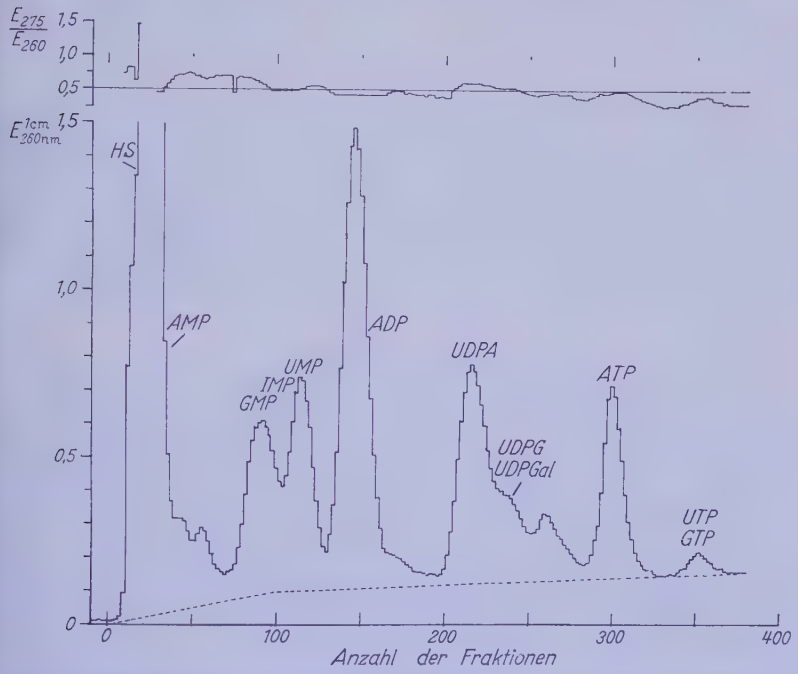


Fig.2. Chromatogramm des sauren Extraktes aus 43 g Schalenabschnitten 16 Tage alter Weinbergschnecken. Fraktion 1—166 = 0—3 M HCOOH; Fraktion 167—249 = 3 M HCOOH, 0—0,2 M $HCOONH_4$; Fraktion 250—400 = 3 M HCOOH, 0,2—1 M $HCOONH_4$

geringe ATP-Gehalt der Schneckenteile ist nicht auf Verluste bei der Präparation zurückzuführen, denn bei der enzymatischen Bestimmung des ATP im frisch hergestellten Perchlorsäure-Extrakt [4] wurde ein ähnlicher Gehalt gefunden (Tab. 1). Wir nehmen daher an, daß auch die übrigen Nucleotide bei der Chromatographie ohne wesentliche Verluste gewonnen werden konnten.

Zur weiteren Charakterisierung wurde die Fraktion der UDP-Hexosen aus den Schalenabschnitten 9 Tage alter Schnecken nach milder saurer Hydrolyse papierchromatographisch getrennt. Es traten zwei Nucleotid-Zonen und eine Zuckerzone auf, deren analytische Daten in der Tab. 2 zusammengefaßt sind. Zone 1 enthielt UDP, Zone 2 UMP. Die Zuckerzone bestand aus Glucose und Galaktose im Verhältnis von etwa

9:1. N-Acetylhexosamine waren nicht nachweisbar. Das Verhältnis von Uridin zu Gesamthexosen betrug 1:1. Die Nucleotidfraktion enthielt demnach etwa 90 % UDP-Glucose und 10 % UDP-Galaktose.

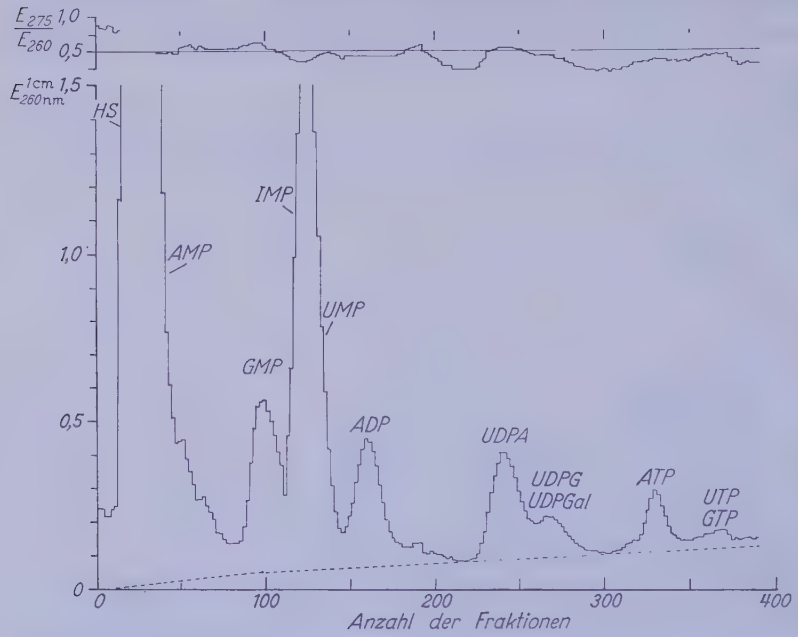


Fig.3. Chromatogramm des sauren Extraktes aus 34 g Fußabschnitten 16 Tage alter Weinbergschnecken. Fraktion 1—159 = 0—3 M HCOOH; Fraktion 160—269 = 3 M HCOOH, 0—0,2 M $HCOONH_4$; Fraktion 270—400 = 3 M HCOOH, 0,2—1 M $HCOONH_4$

Tabelle 1. *Der Gehalt an einigen Nucleotiden bei jungen Weinbergschnecken*

Alter der Tiere (Tage)	Organe[1]	Nucleotidgehalt in nMol/g Frischgewicht						
		AMP	ADP	ATP	UMP	UDP-Hexosen u. Hexosamine	UTP GTP	IMP
1	s	39	28	14 15[2]	11	20	8	3
5	s	82	60	38	29	27	8	19
	f	114	92	34	10	34	3	90
9	s	128	79	26	19	55	7	
	f	95	116	67	24	96	10	152
16	s	122	70	18		76	3	30
	f	56	23	8	15	47	4	193

[1] s = Schalenabschnitt (Magen und Mitteldarmdrüse); f = Fußabschnitt (übrige Organe).

[2] Enzymatisch-optische Bestimmung im frischen Perchlorsäure-Extrakt [4, 5]. Bei 2, 3 und 4 Tage alten Schnecken wurden mit dieser Methode 14, 21 und 17 nMol ATP/g Frischgewicht gefunden.

Tabelle 2. *Analysenwerte der papierchromatographisch getrennten Fraktion der UDP-Hexosen*

Zone	R_F	Komponente in nMol/Zone				Molekül-Verhältnisse	
		U	P	Glucose	Galaktose	U:P	U:Hexosen
1	0,09	273	565	0	0	1:2,08	
2	0,28	126	143	0	0	1:1,14	
3	0,73	0	0	370	39		1:1,03

Etwa 60—70 % der gesamten in den Perchlorsäure-Extrakten vorhandenen Extinktion bei 260 nm wurden nicht vom Ionenaustauscher absorbiert oder waren mit Wasser eluierbar. Diese Eluate wurden nach ihrer Konzentrierung durch Papierchromatographie fraktioniert. Bei den aus den Chromatogrammen extrahierten Substanzen wurde das UV-Spektrum und der Ribosegehalt bestimmt. Neben geringen Mengen an Adenosin und Hypoxanthin wurde vornehmlich Xanthin gefunden.

Diskussion

Bei sehr wenigen Wirbellosen ist bisher der Bestand an freien Nucleotiden bestimmt worden. Die vorliegende Untersuchung scheint die erste zu sein, die an Mollusken durchgeführt wurde. Der Nucleotidgehalt der jungen Weinbergschnecke betrug im Höchstfall 600 nMol/g Frischgewicht. Der Anteil der Adeninnucleotide an diesem Gehalt war bei den verschiedenen Altersstufen meistens kleiner als 50 %. Der Gehalt an Triphosphaten lag stets unter 100 nMol/g Frischgewicht. Der Anteil der UDP-Hexosen und UDP-Hexosamine war mit 10—16 % relativ hoch. Dieses Verteilungsmuster der freien Nucleotide, das nach der Klassifizierung von Schmitz [6] dem „Stoffwechseltyp" zuzuordnen ist, zeigt, daß in den Geweben der jungen Weinbergschnecke vornehmlich Reaktionen des Abbaus und Umbaus stattfinden, weniger dagegen Energietransformationen. Der geringe Nucleotidgehalt der Gewebe läßt vermuten, daß die Umsatzgrößen dieser Reaktionen sehr klein sind. Das träge Verhalten der jungen Schnecken, die sich in dieser Entwicklungsphase noch in ihrer Bruthöhle aufhalten, und ihr geringer Sauerstoff-Verbrauch[1] stützen diese Annahme.

Für den in dieser Zeit erfolgenden Abbau des Galaktogens sind die UDP-Hexosen und UDP-Hexosamine besonders bedeutsam. Die Untersuchung ergab, daß der Gewebegehalt an diesen Nucleotiden zum Teil mehrfach größer ist als der ATP-Gehalt. Das Vorkommen von UDP-Galaktose und UDP-Glucose spricht dafür, daß der Abbau des Galaktogens über Galaktose in den Leloir-Weg mündet. Sämtliche Glieder dieser Reaktionskette konnten in den Schneckengeweben nachgewiesen werden,

[1] Horstmann, H. J.: Manuskript in Vorbereitung.

worüber noch berichtet werden wird[1]. Eine wesentliche Funktion der UDP-N-acetylhexosamine dürfte in ihrer Beteiligung am Aufbau der Mucine des Schneckenschleims liegen. Die Synthese dieser Fußsekrete konnte bereits bei 1 Tag alten Schnecken histochemisch nachgewiesen werden.

Mit fortschreitendem Alter der Tiere nahm auch ihr Gehalt an Harnsäure und Xanthin zu. Da die Weinbergschnecke einen uricotelen Stoffwechsel hat, stammt die Harnsäure wohl vornehmlich aus dem Proteinstoffwechsel der Tiere. Es ist anzunehmen, daß Xanthin ein Glied dieser Reaktionskette ist. Thiele [16] untersuchte die freien Purine erwachsener Weinbergschnecken und fand ebenfalls Xanthin. Er zog in Erwägung, daß dieses Purinderivat aus dem mit der Nahrung aufgenommenen xanthinhaltigen Erdboden stammen könne. Unsere Untersuchungen an jungen Weinbergschnecken, die postembryonal keine Nahrung zu sich nahmen, beweisen nunmehr, daß Xanthin ein Produkt des körpereigenen Stoffwechsels ist.

Material und Methoden

Züchtung der Schnecken. Die von Zuchtschnecken (Fa. R. Stein, Lauingen a. d. Donau) abgelegten Eier wurden in einem dunklen Brutschrank bei 90% relativer Feuchte und 21—23° C bebrütet. Die Schnecken schlüpften nach 15 bis 17 Tagen; sie wurden sogleich in Kunststoff-Schachteln übergeführt und dort bis zu ihrer Verwendung gehalten.

Während dieser Zeit lebten die Tiere von dem Eiinhalt, den sie während ihrer Embryonalentwicklung im Magen gespeichert hatten. Diese Haltung entsprach weitgehend den natürlichen Bedingungen, unter denen die geschlüpften Schnecken noch 2—3 Wochen in ihrer Bruthöhle leben.

Herstellung der Perchlorsäure-Extrakte. Das von Schnittger et al. [1] angegebene Verfahren mußte für die Weinbergschnecke etwas modifiziert werden. Jeweils 400—900 gleichaltrige Tiere wurden in flüssiger Luft gefroren und in Schalen- und Fußabschnitt geteilt. Der Schalenabschnitt enthielt den Magen und die Mitteldarmdrüse, der Fußabschnitt die übrigen Organe. Eine genaue Präparation der Tiere ist bei wenige Tage alten Schnecken nicht möglich, da die Organgrenzen makroskopisch nicht klar erkennbar sind.

Die weitere Verarbeitung der Tiere erfolgte bei einer Temperatur von 0—5° C. Die gefrorenen Organe wurden im Verhältnis 1:7 mit 1,2 N Perchlorsäure versetzt und homogenisiert (Ultraturrax). Der Niederschlag wurde abzentrifugiert, der Bodensatz mit 0,6 N Perchlorsäure nachextrahiert. Die vereinigten Überstände wurden durch tropfenweise Zugabe von 10 N Kalilauge unter Rühren auf pH 2,5—3 eingestellt. Nach Abzentrifugieren und Nachwaschen des Kaliumperchlorat-Niederschlages wurde die überstehende Lösung auf eine Äthanolkonzentration von 40% gebracht. Unter diesen Bedingungen fielen die im Extrakt reichlich vorhandenen Polysaccharide und Glykoproteide aus, während Nucleotide, Zuckerphosphate und niedere Saccharide trotz Gegenwart hoher Konzentrationen an Calciumionen gelöst blieben, was in Modellversuchen ermittelt worden war. Der Überstand der Alkoholfällung wurde im Rotationsverdampfer vom Alkohol befreit, mit 1 N KOH auf pH 6,8 gebracht, danach mit Essigsäure angesäuert und mit Kaliumoxalat bis zur

[1] Siehe Fußnote, S. 27.

Beendigung der Niederschlagsbildung (Calciumoxalat und Kaliumperchlorat) versetzt. Die durch Zentrifugieren geklärte Lösung wurde neutralisiert.

Die Chromatographie der Nucleotide aus dem so vorbereiteten Extrakt der Schnecken ergab keine klar voneinander abgetrennten Gipfel, vermutlich wegen des hohen Salzgehaltes der Lösung. Daher wurden die Nucleotide aus dem zuvor mit Salzsäure auf pH 4 eingestellten Extrakt an Kohle (Norit A, säuregewaschen; 5 mg/ml Extrakt) adsorbiert. Die Kohle wurde mit einer Glasfilternutsche abgesaugt. Die durchgelaufene Lösung wurde neutralisiert und zur Gewinnung der phosphorylierten Zwischenprodukte und der niederen Saccharide verwendet. Die Kohle wurde mehrfach mit Wasser gewaschen, dann zweimal mit 50%igem Äthanol und viermal mit ammoniakalischem (0,1 N) 50%igem Äthanol eluiert. Die Eluate wurden gegebenenfalls sofort neutralisiert und im Rotationsverdampfer vom Alkohol und der Hauptmenge des Wassers befreit. Adsorption der Nucleotide, Waschen der Kohle und die Elutionen wurden in ihrer Wirksamkeit stets durch Messen der Extinktionen bei den Wellenlängen 220—310 nm kontrolliert (Spektralphotometer DK-2, Beckman Instruments). Nucleotidhaltige Eluate wurden vereinigt und zur Säulenchromatographie verwendet.

Säulenchromatographie. [2, 7.] Anionen-Austauscher-Harz (Dowex 2×10, 200—400 mesh, p. a.) wurde in die Formiat-Form übergeführt [1]. Die Säulen (1×15 cm) wurden vor jedem Lauf mit 40 ml 80%iger Ameisensäure regeneriert und mit Wasser bis zur neutralen Reaktion des Durchlaufs gewaschen.

Nach Adsorption der Nucleotide aus neutraler Lösung wurde die Säule mit Wasser bis zur Abnahme der Extinktion bei 260 nm gewaschen. Nur etwa 30—40% der gesamten im Extrakt vorhandenen Extinktion blieben an der Säule adsorbiert. Diese Nucleotide wurden durch Gradientenelution mit Ameisensäure und Ammoniumformiat-Ameisensäure-Lösung vom Austauscher verdrängt [1]. Es wurden lineare Konzentrationsgradienten verwendet [8]. Die automatisch gesammelten Fraktionen (Volumen 1,8 ml) wurden bei den Wellenlängen 260 nm und 275 nm gemessen [2, 7]. Die nucleotidhaltigen Fraktionen eines Gipfels wurden vereinigt, die Nucleotide an Kohle adsorbiert und wie oben eluiert. Eluate, die Derivate des UDP enthielten, wurden in der Kälte aufgefangen und neutralisiert, bevor der Alkohol im Rotationsverdampfer vertrieben wurde.

Identifizierung der Nucleotide. Die Lage im Chromatogramm und das Extinktionsverhältnis 275 nm/260 nm gaben bereits Hinweise auf die Basenkomponente der Nucleotide [1, 7]. In den alkoholfreien Eluaten deutlich abgetrennter Gipfel konnten die Basen durch Messung bei verschiedenem pH an ihren charakteristischen UV-Spektren identifiziert werden [3].

Eluate, die mehrere nicht voneinander getrennte Nucleotide enthielten, wurden durch Papierchromatographie oder Rechromatographie an Austauscher-Säulen in ihre Komponenten zerlegt. Die unter der UV-Lampe (254 nm) lokalisierten Zonen papierchromatographisch getrennter Nucleotide (Papier Schl. & Sch. 2071, säuregewaschen; Fließmittel Äthanol/1 M Ammoniumacetat 1:1; zweimal aufsteigend mit Zwischentrocknung) wurden ausgeschnitten und zunächst mit 96%igem Äthanol zur Entfernung des Ammoniumacetats eluiert. Die Nucleotide wurden anschließend mit Wasser aus dem Papier extrahiert. Die wäßrigen Extrakte wurden danach dreimal mit Äther durchgeschüttelt, um ätherlösliche und die nachfolgende Untersuchung störende Bestandteile des Papiers zu entfernen. Die nucleotidhaltige wäßrige Phase wurde eingeengt und spektralphotometrisch untersucht. Den Leerwert lieferte das Eluat einer nucleotidfreien Zone desselben Chromatogramms.

In einigen Fällen wurden sich überschneidende Gipfel nach ihrer Elution aus Kohle durch Rechromatographie fraktioniert [9]. Die alkoholfreien Eluate wurden

an einer Dowex 2×10-Formiat-Säule (1×12 cm) adsorbiert und durch Ammoniumformiat-Puffer vom pH 4 linear steigender Konzentration eluiert. Die getrennten Gipfel wurden an Kohle adsorbiert und wie bisher eluiert.

Folgende Bestimmungen wurden durchgeführt: D-Glucose mit Glucoseoxydase[1] [10], D-Galaktose mit Galaktoseoxydase[2] [11, 12], N-Acetyl-hexosamine mit dem Elson-Morgan-Reagens [13], Ribose mit Orcin [14], Phosphat nach LOWRY [15] in der Modifikation von SCHNITGER et al. [1]. Parallel zur Säulenchromatographie wurde der ATP-Gehalt bei 1—4 Tage alten Schnecken nach Frierstopp im Perchlorsäure-Extrakt enzymatisch-optisch bestimmt [4, 5].

Frau E. I. MITTENDORF danke ich für ihre geschickte technische Mitarbeit.

Literatur

[1] SCHNITGER, H., K. PAPENBERG, E. GANSE, R. CZOK, TH. BÜCHER u. H. ADAM: Biochem. Z. **332**, 167 (1959).
[2] COHN, W.: J. cell. comp. Physiol. **38**, Suppl. I, 21 (1951).
[3] BEAVEN, G. H., E. R. HOLIDAY, and E. A. JOHNSON: Optical properties of nucleic acids and their components. In: E. CHARGAFF and J. N. DAVIDSON: The nucleic acids, Vol. I, p. 493. New York: Academic Press 1955.
[4] BERGMEYER, H. U.: Methoden der enzymatischen Analyse, S. 543. Weinheim: Verlag Chemie 1962.
[5] HOHORST, H. J., F. H. KREUTZ u. TH. BÜCHER: Biochem. Z. **332**, 18 (1959).
[6] SCHMITZ, H.: Vorkommen und Bedeutung von freien Nucleotiden in Zellen und Geweben. In: 11. Coll. d. Gesellsch. für Physiologische Chemie: Zur Bedeutung der freien Nucleotide, S. 1. Berlin, Göttingen, Heidelberg: Springer 1961.
[7] HURLBERT, R. B., H. SCHMITZ, A. F. BRUMM, and R. VAN POTTER: J. biol. Chem. **209**, 23 (1954).
[8] LAKSHMANAN, T. K., u. S. LIEBERMAN: Arch. Biochem. **45**, 235 (1953).
[9] SCHMITZ, H.: Biochem. Z. **325**, 555 (1954).
[10] HUGGET, A. ST. G., and D. A. NIXON: Biochem. J. **66**, 12P (1956).
[11] AVIGAD, G., D. AMARAL, C. ASENSIO, and B. L. HORECKER: J. biol. Chem. **237**, 2736 (1962).
[12] FISCHER, W., u. J. ZAPF: Hoppe-Seylers Z. physiol. Chem. **337**, 186 (1964).
[13] REISSIG, J. L., J. L. STROMINGER, and L. F. LELOIR: J. biol. Chem. **217**, 959 (1955).
[14] DISCHE, Z., u. K. SCHWARZ: Mikrochim. Acta **2**, 13 (1937).
[15] LOWRY, O. H., N. R. ROBERTS, K. Y. LEINER, M. L. WU, and A. L. FARR: J. biol. Chem. **207**, 1 (1954).
[16] THIELE, O. W.: Hoppe-Seylers Z. physiol. Chem. **332**, 319 (1963).

Dozent Dr. H. J. HORSTMANN,
Physiologisch-Chemisches Institut der Universität,
852 Erlangen, Wasserturmstraße 5

[1] Handelspräparat der Fa. C. F. Boehringer & Soehne GmbH, Mannheim-Waldhof.

[2] Handelspräparat der Fa. Worthington, Freehold, N. J., USA.